

**LORENA MELO VIEIRA**

**EXPRESSÃO DO GENE *ASYMMETRIC LEAVES1* (AS1) EM EXPLANTES RADICULARES  
DE *Passiflora edulis* SIMS E ORGANOGÊNESE *in vitro* EM *Passiflora setacea* D.C.  
(PASSIFLORACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011**

**LORENA MELO VIEIRA**

**EXPRESSÃO DO GENE *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* EM EXPLANTES RADICULARES  
DE *Passiflora edulis* SIMS E ORGANOGÊNESE *in vitro* EM *Passiflora setacea* D.C.  
(PASSIFLORACEAE)**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Botânica, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.**

APROVADA: 16 de fevereiro de 2011.

---

Dr. Leonardo Lucas Carnevalli Dias

---

Prof<sup>ª</sup> Luzimar Campos da Silva  
(Co-orientadora)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

*“Quando não há mais fé, Deus diz: Acredita!”*

*A meu pai Pedro Jorge, exemplo de homem  
A minha mãe Gercina, pelo amor incondicional  
A minha vovó Nora, pelos sábios conselhos...*

*Ofereço,*

*Ao meu irmão Leony, pela bondade de coração  
A meu sobrinho e afilhado Davi, luz da minha vida  
A todos os meus familiares e amigos...*

*Dedico,*

*“Oh fruto sagrado que desceu do céu!  
Vegetal tesouro por onde encontrado!  
Planta genuína do nobre Cerrado  
Generosa espécie espalhada ao léu  
Por vales, montanhas, ladeiras e serras  
Que tanto valoriza as brasileiras terras  
É o vinho dourado do irmão que labora  
Este tão amado gênero **Passiflora**”.*

*(Geovane Alves de Andrade)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me permitir sonhar e ter me dado a capacidade de transformar meus sonhos em realidade...

Aos meus pais pelo referencial familiar: *Mainha* por todo amor e dedicação e *Painho* por me transmitir valores éticos e morais que nenhuma instituição me daria;

À Leony, Davi, *Ale* e *Dé*, mesmo distantes me proporcionam muitas alegrias;

À minha vovó *Nora* que as 96 anos não exaure de me ensinar sobre a vida, a fé em Deus e o amor ao próximo;

À Universidade Federal de Viçosa, em especial a coordenação do curso de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realizar esse curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por me conceder recursos financeiros durante o curso de mestrado;

Ao professor e orientador Wagner Campos Otoni pelo incentivo e a confiança em mim depositada, pelo exemplo de pessoa e de profissional;

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal pela amizade e conhecimentos transmitidos, e em especial a professora Luzimar Campos da Silva pela orientação e amizade;

Ao Dr. Leonardo Lucas Carnevalli Dias por aceitar compor a banca examinadora;

Ao professor Marcelo Carnier Dornelas, por ceder os clones de cDNA do banco de dados do projeto PASSIOMA;

À Lílian Cristina Baldon Aizza pelo auxílio e apoio para realização da hibridização *in situ* no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UNICAMP;

A José Marcello Salabert de Campos e Lyderson Faccio Viccini da Universidade Federal de Juiz de Fora pela realização das análises de citometria de fluxo;

Ao meu “inseparável” amigo Diego Ismael Rocha, que durante esses dois anos foi amigo, colega, orientador, estagiário, professor;

À Mariana Futia Taquetti estagiária que me auxiliou na montagem dos experimentos; obrigada pela força!

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos: Ana Cláudia, Denise, Joseila, Leandrino, Marcela, Anne, Poliana, Thiago, Elyabe, Aline, Marcos, Joice e em especial o Cleber (por todo auxílio com as análises estatísticas...);

À Elisonete Garcia Lani (Lili) pela confiança e amizade;

À minha querida amiga Suzane Ariádna pela amizade fiel e verdadeira e pela doação das sementes de *Passiflora setacea*;

Ao Herculano, por todo carinho e compreensão, e por sacrificar seus finais de semana para me ajudar a fotografar e avaliar os experimentos;

À minha “irmã” Gláucia (Gau) pelos conselhos, amizade, irmandade, desabafos e momentos compartilhados (“muitas risadas juntas...”);

A todos os colegas e amigos da “Botânica” em especial, *Moranginho, Narão, Mary, Carolzinha, Victor, Luiz, Rolim, Ítalo, Tica, Evelyn*,...

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo apoio, em especial Dya, Day, Nívea;

Aos inesquecíveis amigos do LAM, em especial Wilsão pelas análises estatísticas e a Leo e Olívia por me incentivarem a ingressar na pesquisa;

À minha querida amiga Raíssa, que mesmo longe está sempre comigo;

Aos meus adoráveis e inesquecíveis amigos de Mutans, em especial *Pita*, que se orgulham de mim a cada nova conquista;

A todos os meus tios, primos, amigos, colegas, antigos professores, conhecidos, que de alguma forma, compartilharam comigo cada etapa vencida;

A todos que não foram citados (falhas na memória...), mas estão presentes em meu coração;

*Muito Obrigada!*

## **BIOGRAFIA**

LORENA MELO VIEIRA, filha de Pedro Jorge Veiga Vieira e Gercina da Costa Melo Vieira, nasceu em 22 de dezembro de 1985 no município de Caetité, estado da Bahia.

Graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Montes Claros, em dezembro de 2008. Ingressou no programa de Pós-Graduação em Botânica, em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa em março de 2009 tendo defendido dissertação em fevereiro de 2011.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	4
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DE EXPRESSÃO DO GENE <i>ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)</i> DURANTE A ORGANOGÊNESE <i>in vitro</i> EM EXPLANTES RADICULARES DE <i>Passiflora edulis</i> Sims (PASSIFLORACEAE)	
RESUMO .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Indução da organogênese em raízes e coleta do material vegetal para hibridização <i>in situ</i> .....	13
2.2. Caracterização da expressão do gene <i>ASYMMETRIC LEAVES 1</i> .....	13
2.3. Produção da sonda <i>antisense</i> do gene <i>PeAS1</i> .....	14
2.4. Hibridização <i>in situ</i> .....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
CAPÍTULO II - ORGANOGÊNESE <i>in vitro</i> DE <i>Passiflora setacea</i> D.C (PASSIFLORACEAE): INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPLANTE, REGULADORES DE CRESCIMENTO E CONDIÇÃO DE INCUBAÇÃO	
RESUMO .....	27
1. INTRODUÇÃO .....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
2.1. Material Vegetal .....	32
2.2. Organogênese <i>in vitro</i> .....	32
2.3. Alongamento e aclimatização .....	33
2.4. Análise anatômica .....	33
2.5. Análise de citometria de fluxo .....	34
2.6. Avaliações estatísticas .....	35
3. RESULTADOS.....	36
4. DISCUSSÃO .....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	58

## RESUMO

VIEIRA, Lorena Melo, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Expressão do gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* em explantes radiculares de *Passiflora edulis* Sims e organogênese *in vitro* em *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae).** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientador: Luzimar Campos da Silva.

O presente estudo teve como objetivos caracterizar a expressão do gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, via hibridização *in situ*, durante a regeneração *in vitro* de segmentos radiculares de *Passiflora edulis* Sims, espécie comercialmente cultivada, e estabelecer um protocolo reproduzível via organogênese *in vitro* em *Passiflora setacea*, espécie silvestre. Explantes radiculares de *P. edulis* foram cultivados em meio MS, para indução de organogênese de ramos, suplementado com 2,35  $\mu\text{M}$  de BA. Para detecção do gene *PeAS1* pela hibridização *in situ* foi produzido uma sonda *antisense*, utilizando-se fragmentos de cDNA com 900 pb. A visualização do sinal de hibridização foi obtida utilizando-se a solução comercial de NBT/BCIP como substrato para fosfatase alcalina. Após 12 dias em meio de indução, meristemóides foram formados, via organogênese direta. Nos meristemóides, a reação positiva a hibridização *in situ* por imunodeteção evidenciou a presença de transcritos do gene *PeAS1*. Em gemas formadas a partir dos meristemóides, após 25 dias de cultivo, o gene *PeAS1* foi expresso nas regiões do domo e primórdios foliares. Para a indução de organogênese *in vitro* em *P. setacea*, explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares foram cultivados em meio MS suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de Benzilaminopurina (BA); 2,27  $\mu\text{M}$  de Tidiazuron (TDZ) ou em combinação com BA (4,44  $\mu\text{M}$ ) + TDZ (2,27  $\mu\text{M}$ ), sob dois regimes luminosos (16h de luz e escuro). No tratamento controle, não houve adição de fitorregulador. Os padrões de regeneração direta e indireta foram observados em explantes hipocotiledonares e radiculares. Em explantes foliares, a regeneração ocorreu somente a partir de calos. Nos hipocótilos, os meios suplementados por BA na luz ou BA+TDZ em ambas as condições de incubação proporcionaram maior média de brotações. Em explantes radiculares, a

maior frequência de regeneração foi observada quando cultivados em meio com BA+TDZ na luz porém, nessas condições, a análise de citometria de fluxo constatou aumento na quantidade média de DNA nuclear, em dois de cinco regenerantes analisados, quando comparado ao material oriundo de sementes. A mesma composição do meio e condição de incubação não induziu poliploidia em regenerantes oriundos de explantes hipocotiledonares. Conclui-se que o tipo de explante, a composição do meio de cultivo e as condições de incubação tiveram influência na morfogênese *in vitro* de *Passiflora setacea*. O presente trabalho relata, pela primeira vez, informações de nível molecular do processo organogênico a partir de explantes radiculares em *P. edulis*, bem como a obtenção de organogênese *in vitro* e a caracterização da estabilidade genética de regenerantes da espécie silvestre *P. setacea*, possibilitando a sua utilização em programas de melhoramento genético.

## ABSTRACT

VIEIRA, Lorena Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Expression of the gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* in root explants from *Passiflora edulis* Sims and organogenesis *in vitro* in *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae).**  
Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisor: Luzimar Campos da Silva.

This study aimed to characterize the expression of *ASYMMETRIC LEAVES1* (PeAS1) gene via *in situ* hybridization, during *in vitro* regeneration from root segments of *Passiflora edulis* Sims, a species typically commercial, and establish a protocol which could be repeated, via organogenesis *in vitro* in *Passiflora setacea*, a wild species. Root explants from *P. edulis* were cultured on MS medium for organogenesis induction in branches, supplemented with 2.35 mM BA. For PeAS1 gene detection by *in situ* hybridization it was produced an antisense probe, using cDNA fragments that had 900 pb. The visualization of the hybridization signal was obtained using a commercial solution of NBT / BCIP as a substrate for alkaline phosphatase. After 12 days on induction medium, meristems were formed via direct organogenesis. In this group of cells, the immunodetection positive reaction on *in situ* hybridization showed the presence of gene transcripts PeAS1. In buds that has its sources in meristems, PeAS1 gene was expressed in dome and leaf primordia regions, after 25 days of cultivation. For induction of organogenesis *in vitro* in *P. setacea*, leaf, hypocotyl and root explants were cultured on MS medium supplemented with 4.44 mM benzylaminopurine (BA), 2.27 mM thidiazuron (TDZ) or in combination with BA (4.44 mM) + TDZ (2.27 mM) under two distinct light conditions (16h light and dark). For the control treatment, there was no addition of plant growth regulator. Patterns of direct and indirect regeneration were observed in hypocotyls and root. Leaf explants, regeneration only occurred from callus. In hypocotyls, the media supplemented with BA at light condition or BA + TDZ in both incubation conditions provided a higher average of shoots. In root explants, the highest frequency of regeneration was observed when it was cultured in BA + TDZ at light medium. However, under these conditions, the analysis of flow cytometry showed an increase in the average amount of nuclear DNA, in two of five regenerants analyzed, when compared to material derived from seeds. The same medium composition and

incubation conditions did not induce polyploidy in regenerating from hypocotyls. It is concluded that the explant type, composition of culture medium and incubation conditions had influence on *in vitro* morphogenesis of *Passiflora setacea*. This paper describes, for the first time, information on the molecular aspects of organogenic process from root explants in *P. edulis*, as well obtaining organogenesis *in vitro* and characterization of the genetic stability of regenerants from *P. setacea*. These advances enable the employment of this wild species in breeding programs.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Passifloraceae apresenta grande número de espécies, sendo o gênero *Passiflora* o mais representativo, com cerca de 600 espécies tropicais e subtropicais. Dentre essas, 150 são nativas do Brasil e seu maior pólo de dispersão se encontra na região Centro-Oeste e Norte do país (Silva e São José, 1994; Martins, 2006; Pinto et al., 2010). A grande variabilidade genética, de muitas dessas espécies, implica em características interessantes para sua utilização em programas de melhoramento genético, visando ao aumento na produção, na qualidade dos frutos e de resistência a doenças (Vieira e Carneiro, 2004; Zerbini et al., 2008).

Para o gênero *Passiflora*, a via morfogênica de regeneração *in vitro* mais utilizada é a organogênese. Essa pode ocorrer direta (Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004) ou indiretamente (Monteiro et al., 2000; Lombardi et al., 2007), dependendo do tipo de explante e genótipo utilizado. Os primeiros relatos da aplicação da cultura de tecidos em *Passiflora* iniciaram-se com a produção de brotações adventícias no cultivo de segmentos de caule de plantas adultas de *P. caerulea* (Nakayama, 1966).

Alguns autores relataram protocolos para regeneração *in vitro* de espécies de maracujás utilizando como fontes de explantes: segmentos nodais (Drew, 1991; Ribeiro et al., 2006), ápices caulinares (Dornelas e Vieira, 1994; Faria e Segura, 1997; Ribeiro et al., 2006), segmentos de hipocótilo e epicótilo (Faria e Segura, 1997; Biasi et al., 2000; Fernando et al., 2007; Dias et al., 2009; Pinto et al., 2010), discos foliares (Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004; Trevisan e Mendes, 2005; Pinto et al., 2010), gavinhas (Dornelas e Vieira, 1994) e explantes radiculares (Lombardi et al., 2007; Silva, 2009).

A utilização de raízes na regeneração *in vitro* tem se mostrado um excelente modelo para estudos fisiológicos, anatômicos e moleculares (Atta et al., 2009). A capacidade de pluripotência das células vegetais diferenciadas em expressarem um novo padrão de diferenciação pode ser observada em explantes radiculares (Fambrini et al., 2003).

O estabelecimento e a manutenção de meristemas apicais caulinares que surgem em raízes, utilizadas como explantes, expõem questões intrigantes e parecem necessitar de uma sequência de expressão gênica padronizada para sua formação. O gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* está relacionado a esse processo e, de alguma maneira,

possibilita a especificação de uma identidade adaxial foliar (Byrne, 2005; Fu et al., 2007; Ikezaki et al., 2010). Técnicas de hibridização *in situ* permitem acompanhar a dinâmica de expressão gênica no decurso da formação dos meristemas (Atta et al., 2009).

As respostas morfogênicas de plantas e tecidos cultivados *in vitro* são afetadas por diferentes componentes de meios de cultura, sendo importante avaliar seus efeitos sobre a regeneração das plantas. Os fitohormônios podem, em sua maioria, desempenhar função reguladora em concentrações baixas, apresentando influência tanto antagônica quanto sinérgica, nos diferentes fenômenos que envolvem o desenvolvimento da planta (Nutsch, 2000). A aplicação de 6-benzilaminopurina (BA) e Tiazuron (TDZ) têm apresentado resultados favoráveis à indução de organogênese em *Passiflora* (Pinto et al., 2010; Zerbini et al., 2008). Contudo, o potencial propagativo depende da procedência do explante e da espécie estudada (Apezato-da-Glória et al., 1999).

O Brasil, atualmente, é o maior produtor de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) segundo Meletti et al. (2005) e IBGE (2006) e a espécie destaca-se pela produção de frutos ricos em vitaminas e minerais, e pela qualidade do suco (Braga et al., 2005). Também é utilizada como ornamental, devido à imponência de suas flores, e com ação medicinal, explorando suas propriedades sedativas (Souza e Meletti, 1997). Entretanto, os principais problemas enfrentados pelos passicultores são as doenças de etiologia viral (Hanweg, 1999; Zerbini et al., 2008) e fitopatógenos do solo (Junqueira et al., 1999; Meletti e Bruckner, 2001), que limitam a produção dos frutos e expansão da cultura (Brancaaglione et al., 2009).

Entre as espécies silvestres com possibilidades de uso na alimentação humana, *Passiflora setacea* D. C. conhecida como “maracujá-sururuca”, “maracujá-do-sono” ou “maracujá-do-cerrado” apresenta boas perspectivas de mercado para consumo *in natura*, na forma de sucos ou produção de doces (Oliveira e Ruggiero, 2005). Essa espécie tem sido relatada como excelente fonte de resistência a fitopatógenos do solo (Menezes et al., 1994; Oliveira, 2000; Fischer, 2003; Cardoso-Silva et al., 2007), entretanto, apresenta dormência nas sementes e desuniformidade de germinação (Meletti et al., 2002). As técnicas de cultura de tecidos seriam uma alternativa para propagação da espécie. No entanto, requer protocolos eficientes para o sucesso da regeneração de plantas *in vitro* (Santos et al., 2010).

A obtenção de maracujá comercial (*Passiflora edulis* Sims) resistente a doenças depende da inserção de genes de resistência de espécies silvestres para as espécies cultivadas, já que híbridos sexuais têm apresentado baixa fertilidade. Uma alternativa viável seria a obtenção de híbridos somáticos, advindos de técnicas de cultura de tecidos. Todavia, para aplicação dessa tecnologia, reforça-se a necessidade de otimização de protocolos de regeneração via organogênese *in vitro* e estabelecimento e manutenção de culturas de células em suspensão para espécies como *P. setacea*.

Muitos trabalhos já relataram a organogênese por meio da cultura de tecidos em Passifloráceas, especialmente em *P. edulis* (Passos e Bernacci, 2005). Entretanto, ainda há carência de protocolos eficientes de regeneração, desenvolvimento, e conservação *in vitro*, para a maioria das espécies, principalmente espécies pouco domesticadas, como *P. setacea*, em que a variabilidade genética existente é muito grande (Farias et al., 2005). Embora alguns autores tenham reportado a propagação *in vitro* mediante germinação *in vitro* de *P. setacea*, não há relatos de trabalhos que caracterizem a organogênese *in vitro* desta espécie, bem como a variação na estabilidade genética dos seus regenerantes submetidos a diferentes reguladores de crescimento.

Nesse sentido, dado o potencial organogênico da espécie *Passiflora edulis*, especialmente em explantes radiculares, e a escassez de trabalhos sobre a otimização de protocolos de regeneração via organogênese *in vitro* em *Passiflora setacea*, alicerçado em técnicas de cultura *in vitro*, pretende-se:

- Induzir a organogênese *in vitro* em explantes radiculares de *P. edulis* e, por meio da técnica de hibridização *in situ*, caracterizar a dinâmica de expressão do gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*;
- Estabelecer um protocolo reproduzível de regeneração *in vitro*, via organogênese, em *P. setacea* e analisar a estabilidade genética dos seus regenerantes.



## 2. REFERÊNCIAS

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* morphogenesis in leaf explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 2007-2013, 1999.
- ATTA, R.; LAURENS, L.; OUCHERON-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**, v. 57, p. 626-644, 2009.
- BECERRA, D. C.; FERNANDO, A. P.; GÓNGORA, G. G. Age and physiological condition os donor affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 87-90, 2004.
- BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUES, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 661-665, 2000.
- BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P. Maracujá doce: melhoramento genético e germoplasma. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 601-616, 2005.
- BRANCAGLIONE, P.; SAMPAIO, A. C.; FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. M.; FUMIS, T. F. Eficiência de argila silicatada no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *in vitro* e em mudas de maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 718-724, 2009.
- BYRNE, M. E. Shoot development-genetic interactions in the meristem. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 1499-1501, 2005.
- CARDOSO-SILVA, C. B.; MELO, J. R. F.; PEREIRA, A. S.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; OLIVEIRA, A. C. Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico-química de frutos de maracujazeiros-do-sono nativos do estado da Bahia. **Magistra**, v.19, p. 352-358, 2007.
- DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D. M.; BARROS, R. S.; FLOH, E. L. S.; OTONI, W. C. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 199-208, 2009.

- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, p. 211-217, 1994.
- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 23-27, 1991.
- FAMBRINI, M.; GIONINE, G.; CONTI, A.; MICHELOTTI, V.; PUGLIESI, C. Origin and development *in vitro* of shoot buds and somatic embryos from intact roots of *Helianthus annuus* X *H. tuberosus*. **Annals of Botany**, v.92, p. 145-151, 2003.
- 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**, v. 33, p. 209–212, 1997.
- FARIAS, M. A. A.; CUNHA, M. A. P.; FARIA, G. A.; PEIXOTO, C.P. Breeding of yellow passionfruit by stratified mass selection and competition with regional populations. **Magistra**, v. 17, p. 142-145, 2005.
- 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**, v. 91, p. 37–44, 2007.
- FISCHER, I. H. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “Morte Prematura” do maracujazeiro causada por *Nectria haematococca* e *Phytophthora parasitica*. Piracicaba SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2003.
- FU, Y.; XU, L.; XU, B.; YANG, L.; LING, Q.; WANG, H.; HUANG, H. Genetic interactions between leaf polarity-controlling genes and *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 in *Arabidopsis* leaf patterning. **Plant Cell Physiology**, v.48, p. 724–735, 2007.
- 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**, v. 48, p. 673–680, 2000.
- HANWEG, K. Virus-free granadilla cultivars. **Neotropica bulletin, Nelspruit**, v. 304, p. 7-8, 1999.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Culturas temporárias e permanentes**. Produção Agrícola Municipal. (2006).
- IKEZAKI, M.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; KOJIMA, S.; UENO, Y.; MACHIDA, C.; MACHIDA, Y. Genetic networks regulated by *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) and *AS2* in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: *Knox* genes control five morphological events. **The Plant Journal**, v. 61, p. 70-82, 2010.

- JUNQUEIRA, N. T. V.; ICUMA, I. M.; VERAS, M. C. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; DOS ANJOS, J. R. N. Cultura de Maracujazeiro. In: Incentivo a Fruticultura no Distrito Federal: Manual de Fruticultura. Brasília, Coolabora, p. 42-53, 1999.
- LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. 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**, v. 50, p. 239-247, 2007.
- MARTINS, I. Reações de patógenos de maracujazeiro-azedo de *Colletotrichum gloesporioides* e o controle da antracnose com *Trichoderma* spp., Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília, UnB, p.137, 2006.
- MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: Bruckner, C. H., Picanço, M. C (Eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385, 2001.
- MELETTI, L. M. M.; FURLANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; FILHO, J. A. A. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O Agrônomo**, v. 54, p. 30-33, 2002.
- MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. DA S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-78, 2005.
- MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATTO, D. A. Avaliação das taxas de pegamento sobre as espécies tolerantes à morte prematura de plantas. **Científica**, v. 22, p. 95-104, 1994.
- MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKASAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 571-573, 2000.
- NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tecidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Planta**, v. 42, p.63-74, 1966.
- NULTSCH, W. **Botânica Geral**. 10ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, p. 474, 2000.
- OLIVEIRA, J. A. Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e desenvolvimento de maracujá-doce por estaquia. Brasília DF, Universidade de Brasília. 2000.
- OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 143-158, 2005.

- PASSOS, I. R. S.; BERNACCI, L. C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção do germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* sp.) . In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.361-383, 2005.
- PINTO, A. P.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 28-33, 2010.
- RIBEIRO, L. M.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, S. R. M. de.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; FONSECA, R. S.; VIEIRA, L. M. Organogênese *in vitro* em acessos de maracujazeiros amarelo infectados pelo vírus CABMV. **Unimontes Científica**, v. 8, p. 87-98, 2006.
- SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C.; SANTOS, F. C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, v. 57, p. 112-117, 2010.
- SILVA, A. C.; SÃO JOSÉ, A. R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: São José, A. R. (Ed). **Maracujá: produção e mercado**. 1a. ed., p. 1-5, 1994.
- SILVA, C. V. Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis*. Tese (Doutorado), Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p. 82. 2009.
- SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, p.179, 1997.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v. 62, p. 346-350, 2005.
- VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. *Passiflora* spp., Passionfruit. In: LITZ, R. E. (Ed). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Oxford: CABI Publishing, p. 435-453, 2004.
- ZERBINI, F. M.; OTONI, W. C.; VIEIRA, M. L. C. Transgenic passionfruit. In: KOLE, C.; HALL, T. (Eds). **A Compendium of Transgenic Crop Plants - Tropical and Subtropical Fruits and Nuts**. 1 ed. Berlin: John Wiley & Sons, p. 213-234, 2008.

## CAPÍTULO I

---

### **CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* DURANTE A ORGANOGÊNESE *in vitro* EM EXPLANTES RADICULARES DE *Passiflora edulis* SIMS (PASSIFLORACEAE)**

#### **Resumo**

O surgimento de meristemas apicais caulinares em órgãos diferenciados, como as raízes, requer uma sequência de expressão gênica padronizada. O gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* está relacionado ao processo organogênico e é expresso em células meristemáticas foliares. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão do gene *PeAS1*, via hibridização *in situ*, durante a organogênese em segmentos radiculares de *Passiflora edulis* Sims. Explantes radiculares foram colocados em meio indutor de organogênese de ramos e coletados em diferentes estádios de desenvolvimento (0, 6, 12 e 25 dias). Para detecção do gene *PeAS1* pela técnica de hibridização *in situ* foi produzido uma sonda *antisense*, utilizando-se fragmentos de cDNA com 900 pb. A visualização do sinal de hibridização foi obtida utilizando-se a solução comercial de NBT/BCIP como substrato para fosfatase alcalina. Não foram observados sinais da expressão do gene *PeAS1* nos explantes aos 0 e 6 dias de cultivo em meio indutor. Todavia, após 12 dias em meio de indução, os explantes radiculares produziram meristemóides via organogênese direta. A coloração vermelho escuro a marrom nessas células confirmou a presença de transcritos do gene *PeAS1* via hibridização *in situ* por imunodeteção. Nas regiões subepidérmicas em que ainda não havia formação de meristemóides também foram detectados transcritos do *PeAS1*, indicando que essas células possuem competência organogênica. Após 25 dias de cultivo, observou-se o surgimento endógeno de brotações. Nesse estádio de desenvolvimento, foi notada a expressão do gene *PeAS1*, através de precipitado vermelho escuro, na região do meristema apical caulinar e primórdios foliares. Os resultados desse trabalho revelam que a expressão do gene *PeAS1* inicia-se após 12 dias em meio de indução, bem como a eficiência da técnica de hibridização *in situ* para análises moleculares do processo de organogênese *in vitro* em raízes.

**Palavras chave:** *Passiflora edulis*, organogênese, raiz, hibridização *in situ*, *ASYMMETRIC LEAVES1*.

## 1. INTRODUÇÃO

A via morfogênica de regeneração de plantas *in vitro* mais amplamente aplicada ao gênero *Passiflora* é a organogênese. Foram desenvolvidos vários protocolos a partir da utilização de combinações de reguladores de crescimento (Monteiro et al., 2000; Fernando et al., 2007; Pinto et al., 2010) e tipos de explantes, tais como: segmentos de epicótilo e hipocótilo (Dornelas e Vieira., 1994; Faria e Segura, 1997; Dias et al., 2009), discos foliares (Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004; Trevisan e Mendes, 2005; Ribeiro et al., 2006), gavinhas (Dornelas e Vieira, 1994) e explantes radiculares (Lombardi et al., 2007; Silva, 2009). Quando comparado a outras fontes de explantes não meristemáticas, o cultivo de raízes de passifloráceas tem apresentado capacidade de regeneração favorável, tendo em vista a taxa expressiva de gemas formadas (Lombardi et al., 2007).

Além de análises anatômicas e fisiológicas, as técnicas de clonagem de genes e marcadores moleculares podem ser aplicadas para o entendimento molecular dos processos de desenvolvimento da morfogênese *in vitro* (Meng et al., 2010). Os primeiros relatos dessa nova abordagem foram descritos por Zhang et al. (1998), analisando a expressão do gene *Knotted1* (*KN1*) de milho e seus homólogos durante a proliferação *in vitro* de células meristemáticas e formação de meristemas caulinares em gemas axilares de cevada. A habilidade de regeneração está associada à atividade específica de genes, que são expressos em células ou tecidos, e a sinais moleculares como os fatores de transcrição (Gaj et al., 2005; Srinivasan et al., 2007).

A utilização de raízes como explante tem se mostrado excelente modelo para estudos dos processos morfológicos, fisiológicos, anatômicos e moleculares envolvidos durante a organogênese *in vitro*. A regeneração de raízes tem sido observada em espécies como *Linum usitatissimum* L. (Xiang-Can et al., 1989), *Populus tremula* L. (Vinocur et al., 2000), *Elentherococcus koreanum* (Park et al., 2005), *Melia azedarach* (Vila et al., 2005), *Arachis stenosperma* (Pacheco et al., 2008), e *Arabidopsis* (Atta et al., 2009). Em *P. cincinnata* e *P. edulis* foi relatado regeneração a partir de raízes transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* (Reis et al., 2007). Para essas mesmas espécies de passifloráceas observou-se que o processo de regeneração é assincrônico e que a suplementação do meio com regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BA) é indispensável à resposta organogênica de explantes radiculares (Silva, 2009).

A organogênese em raízes é um primoroso exemplo da capacidade de pluripotência de células vegetais para expressão de um novo padrão de diferenciação (Fambrini et al., 2003). O surgimento de meristemas apicais caulinares em raízes expõe questões intrigantes sobre o estabelecimento e a manutenção dos mesmos, uma vez que seu complexo comportamento requer uma sequência de expressão gênica padronizada.

Em plantas superiores, os mecanismos moleculares que regulam a formação e diferenciação do meristema apical caulinar são ainda pouco conhecidos (Takada et al., 2001). Sabe-se que o gradiente de concentração de auxina gerado pelo seu transporte polar induz a expressão diferencial de genes e, conseqüentemente, a formação de um determinado tecido ou órgão. Dessa maneira, quando um grupo específico de genes é ativado, inicia-se a programação genética mediante transdução em cascata de sinais que culminará no estabelecimento e na manutenção de estruturas ao longo do desenvolvimento da planta (Friml et al., 2003; Jenik et al., 2007; Chandler et al., 2008).

Dentre os genes relacionados ao processo organogênico destaca-se o *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, que é expresso em células meristemáticas foliares (Nurmburg et al., 2007) e possibilita a especificação de uma identidade adaxial foliar (Taiz e Zeiger, 2009). Segundo Byrne et al. (2002) e Byrne (2005) sua atuação está relacionada ao controle da diferenciação celular e ao desenvolvimento normal dos cotilédones. Entretanto, o mecanismo pelo qual esse gene coopera com outros componentes que determinam a polaridade da folha permanece indeterminado (Fu et al., 2007).

O fator de transcrição do domínio MYB, *AS1*, funciona como um heterodímero associado a proteínas que reprimem a atividade do gene *KNOTTED 1-like homeobox (KNOX)* (Nurmburg et al., 2007), responsável pela manutenção da atividade meristemática na região do domo apical (Guo et al., 2008). A visualização da expressão de um gene é interessante para analisar sua função, e mesmo como marcador de diferenciação celular ou do estímulo fisiológico recebido pelas células (Wilkinson, 1995). Técnicas de hibridização *in situ* permitem acompanhar a expressão gênica no decurso da formação dos meristemas (Dornelas et al., 2004; Atta et al., 2009; Martins e Polo, 2009).

O Brasil é o centro de diversidade da família Passifloraceae, com mais de 150 espécies nativas. O elevado número de representantes do gênero *Passiflora* representa uma condição privilegiada quanto aos recursos genéticos (Souza e Meletti, 1997). O maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) destaca-se pela produção de frutos ricos



em vitaminas e minerais, com grande aptidão para a produção de sucos de elevada qualidade (São José et al., 1997; Braga et al., 2005). Essa espécie tem a maior expressão econômica dentro do gênero, respondendo por cerca de 90% dos plantios comerciais. A produção de *P. edulis* é difundida em quase todos os estados brasileiros, gerando renda e se destacando no contexto social pela intensa necessidade de mão-de-obra (Junqueira et al., 1999; Meletti et al., 2005). Apesar de o Brasil ser considerado o maior produtor mundial de maracujá, a produtividade média brasileira ainda é considerada baixa, em decorrência principalmente de problemas fitossanitários, da heterogeneidade dos pomares e das tecnologias de produção, muitas vezes, inadequada (Laranjeiras, 2002).

A expansão das pesquisas que compreendem técnicas desenvolvidas em laboratórios, bem como a criação de bancos de germoplasma utilizados em programas de melhoramento genético pretende dispor-se dos avanços tecnológicos para solucionar os problemas que afetam a passicultura. Estudos que permitem compreender os processos moleculares que envolvem a morfogênese *in vitro* poderiam subsidiar programas de melhoramento genético que buscam alternativas para a propagação clonal em massa da espécie.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a expressão do gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, durante a organogênese *in vitro* de gemas caulinares em explantes radiculares de *Passiflora edulis* Sims.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Indução da organogênese em raízes e coleta do material vegetal para hibridização *in situ***

Para indução da organogênese *in vitro* em *P. edulis* população FB200, a partir de explantes radiculares, foi utilizado o sistema de regeneração proposto por Silva (2009). As sementes sem tegumentos foram desinfestadas e transferidas para frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 40 mL de meio de cultura e 12 sementes, sem tegumento, por frasco, vedados com tampas plásticas. O meio de cultura conteve sais MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al, 1968), 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), com pH ajustado para 5,8, sendo autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

A germinação das sementes ocorreu no escuro, sendo que 15 dias após a inoculação, as plântulas foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e 27° C ± 2° C de temperatura. Após 30 dias de inoculação, as raízes principais das plântulas, com cerca de 10 cm, foram segmentadas em explantes de 10 mm. Esses foram colocados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25-30 mL de meio MS acrescido de 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BA) para indução de organogênese de ramos.

Explantes radiculares foram coletadas em diferentes estádios da fase de indução de organogênese (0, 6, 12 e 25 dias) para realização da técnica de hibridização *in situ*. Esses foram imersos em paraformaldeído 4 % (p/v) por uma noite, sob temperatura de 4° C e, posteriormente, foram desidratadas em séries etanólicas e armazenadas em etanol absoluto a 4° C. Em seguida, as amostras foram infiltradas em solução de etanol:xilol, nas concentrações de 3:1, 1:1, 1:3, a cada 4 horas, seguidas de xilol (100 %) por 8 horas. As amostras foram então transferidas para estufa a 65° C e gradativamente infiltradas com parafina (2-3 dias). Logo depois, as amostras foram emblocadas em parafina em moldes de papel.

### **2.2. Caracterização da expressão do gene *ASYMMETRIC LEAVES1***

As seqüências de *P. edulis* homólogas às proteínas regulatórias do desenvolvimento foliar em *Arabidopsis* e em outras plantas-modelo foram selecionadas e identificadas a partir do banco de dados do Projeto PASSIOMA (Dornelas et al., 2006) com o emprego do algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990). Os clones correspondentes aos homólogos *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) em *P. edulis* (*PeAS1*) foram obtidos da biblioteca de cDNAs do projeto PASSIOMA. As hibridizações *in situ* foram realizadas utilizando sondas não-radioativas, segundo as técnicas descritas na literatura (Dornelas et al., 1999; 2000; com modificações).

### **2.3. Produção da sonda *antisense* do gene *PeAS1***

Com intuito de produzir uma sonda *antisense* do gene *ASYMMETRIC LEAVES1* (*PeAS1*) utilizou-se o fragmento de cDNA contendo 900 pb de *AS1* inserido no vetor pSPORT1 e utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* Top 10, conforme recomendações do fabricante (Invitrogen™).

Quanto à extração do DNA plasmidial, as bactérias foram cultivadas em 1 mL de meio LB líquido (10 g L<sup>-1</sup> triptona; 5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 10 g L<sup>-1</sup> cloreto de sódio) contendo 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina, sob agitação ( $\pm$ 130 rpm) a 37° C, por aproximadamente 4 horas. Dessa suspensão bacteriana, 100 µL foram transferidos para 3 mL de meio LB líquido com 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina e cultivadas *overnight* sob agitação a 37° C. Posteriormente, o DNA plasmidial foi extraído e purificado com utilização do kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen), com exceção do uso de RNase, por se tratar da síntese de uma sonda de RNA.

Em seguida, executou-se a linearização dos plasmídeos, onde foram digeridos 85 µL de DNA plasmidial em 5 µL da enzima *EcoR1*, acrescida de 10 µL de tampão da enzima num volume total de 100 µL. A reação ocorreu em termociclador por 2 horas, a 37° C e, posteriormente, foi transferida para banho-seco a 70° C para paralisar a reação. O DNA plasmidial digerido precipitou-se com a adição de 10 µL de citrato dissódico (1,2 M NaCl; 0,8 M citrato dissódico.5H<sub>2</sub>O) e 500 µL de etanol absoluto gelado, centrifugado por 15 minutos. O excesso de sal foi retirado lavando-se o precipitado com 1 mL de etanol 70 % seguido de etanol absoluto. Depois de seco, o precipitado de DNA plasmidial foi ressuspendido em 13 µL de água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato).

A sonda foi marcada pela incorporação de uracilas conjugadas à digoxigenina (DIG-UTP) utilizando-se, para tanto, o “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)” (Roche Applied Science) segundo recomendações do fabricante. Além dos 13 µL de DNA plasmidial linearizado, acrescentou-se à reação 2 µL do mix de NTPs (nucleotídeos A, C, G e U-DIG), 1 µL de inibidor de RNase, 2 µL da enzima RNA polimerase SP6 e 2 µL do tampão da enzima (10x concentrado). A reação ocorreu em banho-seco, por 2 horas a 37° C. Posteriormente à precipitação do RNA marcado com etanol absoluto, a sonda foi ressuspensa em 100 µL de formamida desionizada armazenada em freezer a -20° C.

#### **2.4. Hibridização *in situ***

Cortes histológicos transversais e longitudinais (7µm) foram dispostos sob lâminas previamente tratadas com solução de acetona: 3-aminopropil-trietoxi-silano (2 %), contendo água tratada com dietilpirocarboneto (DEPC). As técnicas de hibridização *in situ* foram desenvolvidas basicamente em quatro etapas:

**Pré-hibridização:** as lâminas preparadas foram desparafinizadas, utilizando-se banhos com xilol (100 %), solução xilol: etanol nas concentrações 3:1, 1:1 e 1:3 e etanol absoluto. Depois de secas ao ar, as lâminas foram tratadas com proteinase K (1 µg mL<sup>-1</sup> em 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5) por oito minutos a 37° C e, posteriormente, lavadas por duas vezes em água tratada com DEPC, à temperatura ambiente.

**Hibridização:** aproximadamente 300 µL do mix de hibridização (Tris-HCl 1M; NaCl 5M; formamida desionizada; EDTA 0,5 M; solução de Denharts; dextran sulfato 50%) contendo 300-600 ng mL<sup>-1</sup> da sonda do gene *PeAS1*, marcada com DIG-UTP, foram adicionados sob os cortes nas lâminas. A hibridização foi conduzida por uma noite a 42° C.

**Pós-hibridização:** foram realizadas 4 lavagens com tampão de citrato de Sódio (SSC) de 30 minutos cada, a 42° C. As duas primeiras com SSC [4x] (0,6 M NaCl; 0,06M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) e as demais com SSC [2x] (0,3 M NaCl; 0,03M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O). Em seguida, as lâminas foram lavadas por 1 minuto em água autoclavada.

**Imunodeteccção:** o material foi tratado com DB1 (Tris-HCl 1 M; NaCl 5 M; pH 7,5) por 5 minutos seguidos por 30 minutos em solução bloqueadora (1% reagente de bloqueamento Roche, dissolvido em DB1) e, novamente, por 1 minuto em DB1. A deteccção da sonda foi realizada com anticorpo anti-DIG, conjugado à fosfatase alcalina,

diluído em solução de bloqueamento (1:1000) por 1 hora em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes, por 15 minutos cada em DB1 e por 5 minutos em DB3 (Tris-HCl 1 M; NaCl 5 M; MgCl<sub>2</sub> 1 M; pH 9,5). Para a visualização do sinal, utilizou-se uma solução comercial de NBT/BCIP (PIERCE, USA) ('nitro blue tetrazolium' / '5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate toluidine') como substrato da fosfatase alcalina, mantendo as lâminas no escuro, *overnight*. O resultado positivo da hibridização *in situ* corresponde à coloração vermelho escuro a marrom nas células. A observação morfológica dos explantes e o registro fotográfico das lâminas foram realizados em estereomicroscópio (Modelo SZX7, Olympus Optical, Japão) no laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Viçosa e em microscópio invertido (Modelo AXIOVERT 35, Zeiss, Alemanha) no laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, respectivamente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da técnica de hibridização *in situ* foi possível observar que os segmentos radiculares, utilizados como explantes iniciais (0 dia) para regeneração *in vitro*, não apresentaram alteração nas células epidérmicas e subepidérmicas, e portanto, ausência da expressão do gene *ASYMMETRIC LEAVES 1 (PeAS1)* (Fig. 1A e 2A-C). Do mesmo modo, após seis dias de inoculação em meio de indução, os tecidos dos explantes permaneceram sem sinal de expressão do *PeAS1*.

Aos 12 dias de cultivo, ocorreu diferenciação de meristemóides nos explantes radiculares via organogênese direta, em diferentes estádios de desenvolvimento (Fig. 1B). A coloração vermelho escuro a marrom observada nas células da epiderme e das camadas subepidérmicas após a hibridização *in situ*, indicaram a presença de transcritos do *PeAS1*. Nas protuberâncias formadas, os sinais de expressão do *PeAS1* foram detectados em apenas duas ou três camadas de células subepidérmicas (Fig. 2D-E).

Segundo Thorpe (1980), a capacidade de uma célula responder a sinais específicos, provavelmente de natureza hormonal, pode provocar a desdiferenciação de células parenquimáticas e, posteriormente, formar meristemóides que darão origem a órgãos como as folhas. Sendo os meristemóides precursores dos primórdios foliares, as células que apresentaram expressão do gene *PeAS1*, no presente estudo, são as que provavelmente darão origem as gemas caulinares. Assim, sugere-se que o início da formação de células com competência organogênica pode ser observada 12 dias após a indução da regeneração. Mello et al. (2001), observaram em análises anatômicas da organogênese em raízes de *Curcuma zeodoria*, que os meristemóides formados se desenvolviam verticalmente dando origem aos primórdios foliares.

Nas regiões subepidérmicas, onde ainda não havia formação de meristemóides aos 12 dias, também foram observadas células formadas indicando a presença de transcritos do *PeAS1*. Sugere-se que essas células possuem competência organogênica. Silva (2009) relatou que a organogênese de gemas caulinares em explantes radiculares é um processo assíncrono, ocorrendo no mesmo explante gemas em diferentes estádios de desenvolvimento.

Após 25 dias de cultivo em meio de indução de organogênese de ramos (Fig. 1C-D), foram detectados transcritos do gene *PeAS1* na região do meristema apical caulinar e primórdios foliares dos brotos formados (Fig. 2G-I). Em meristemas que ainda não tiveram os primórdios foliares totalmente desenvolvidos, houve forte sinal de hibridização por toda região do meristema apical caulinar, indicando sua alta atividade meristemática (Fig. 2I). Não foram observados sinais de expressão do gene em porções mais basais do meristema, onde predominam as células do meristema fundamental.

As rotas organogênicas nas plantas são controladas por redes de genes que interagem, sendo todo o processo regulado pela sinalização célula-a-célula. Dentre os genes que são expressos no meristema apical caulinar (SAM), encontra-se o *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* requerido para manutenção da proliferação de células no SAM e/ou prevenção de sua diferenciação, garantindo sua identidade meristemática (Sun et al., 2002; Byrne et al., 2000; Byrne et al., 2002; Byrne, 2005). Em contrapartida, a expressão inicial do *AS1* reprime a transcrição do *STM* e outros genes *KNOX* em células formadoras das folhas, permitindo assim, a diferenciação celular e o desenvolvimento dos primórdios foliares (Sun et al., 2002; Li et al., 2005).

Para a manutenção do SAM e especificação dos órgãos laterais ocorre, naturalmente, a regulação da expressão desses e de outros genes que interagem para diferenciação dos fitomêros (Byrne et al., 2002; Guo et al., 2008). Li et al. (2005) relataram a importância de estudos para verificarem se há envolvimento de outros genes além de *AS1* e *AS2* no processo de padronização da folha e no seu desenvolvimento. Apesar de, no presente trabalho, ter sido observado apenas a expressão do gene *PeAS1* na formação de brotos, outros genes poderiam estar envolvidos no processo organogênico em raízes. Dessa forma, sugere-se outros estudos para avaliar a expressão e regulação de outros genes envolvidos neste processo.

Em *Arabidopsis thaliana*, o desenvolvimento e a manutenção do SAM foi amplamente estudado e uma série de genes foram relacionados com a formação dos órgãos vegetativos e reprodutivos. O gene *AS1* é expresso na região dos primórdios foliares, atuando na diferenciação celular e permitindo uma identidade foliar (Byrne et al., 2002). O mesmo perfil de expressão foi observado neste trabalho, via hibridização *in situ*, na regeneração *in vitro* de explantes radiculares de *Passiflora edulis*, sugerindo que o *PeAS1* seja um ortólogo putativo do *AS1* em *Arabidopsis*.

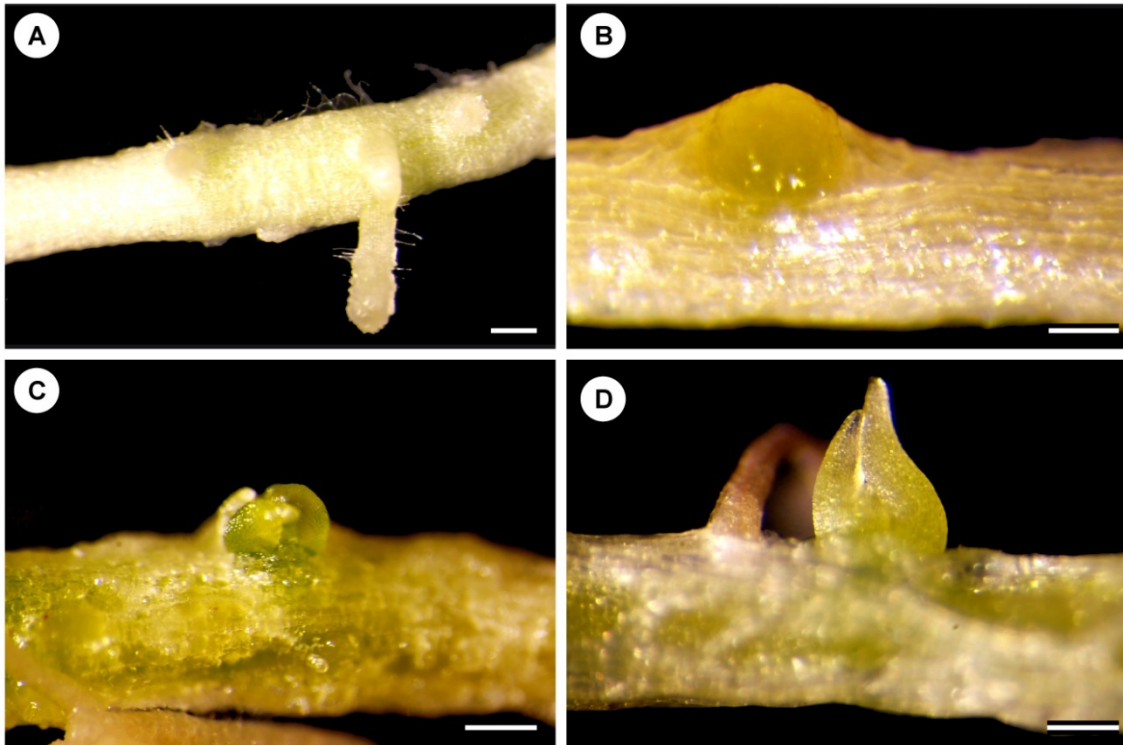
Byrne et al. (2000) observaram que o padrão de expressão do *AS1* no desenvolvimento de embriões de *Arabidopsis*, visualizado pela hibridização *in situ*, revelou que o RNA de *AS1* aparece primeiramente no estágio globular, é mantido no estágio de torpedo mas, posteriormente, foi reduzido ou ausente nas células que formam o meristema apical. No presente trabalho, a atividade do gene foi avaliada apenas até 25 dias de indução e foi encontrada alta expressão, visto que na região do SAM houve forte sinal de hibridização. Talvez, o tempo de avaliação da expressão do gene *PeAS1*, neste trabalho, tenha sido insuficiente para diagnosticar o momento em que o gene cessou sua atividade.

Evidenciou-se, em *A. thaliana*, altos níveis de expressão do *AS1* em tecidos com células altamente proliferativas, e foi atribuído um importante papel desse gene na divisão e na diferenciação celular (Sun et al., 2002). Esses dados corroboram os resultados encontrados no presente trabalho, já que a expressão do gene *PeAS1* foi intensificada nos explantes com 25 dias, caracterizando uma maior atividade meristemática na região do SAM (Fig. 2H).

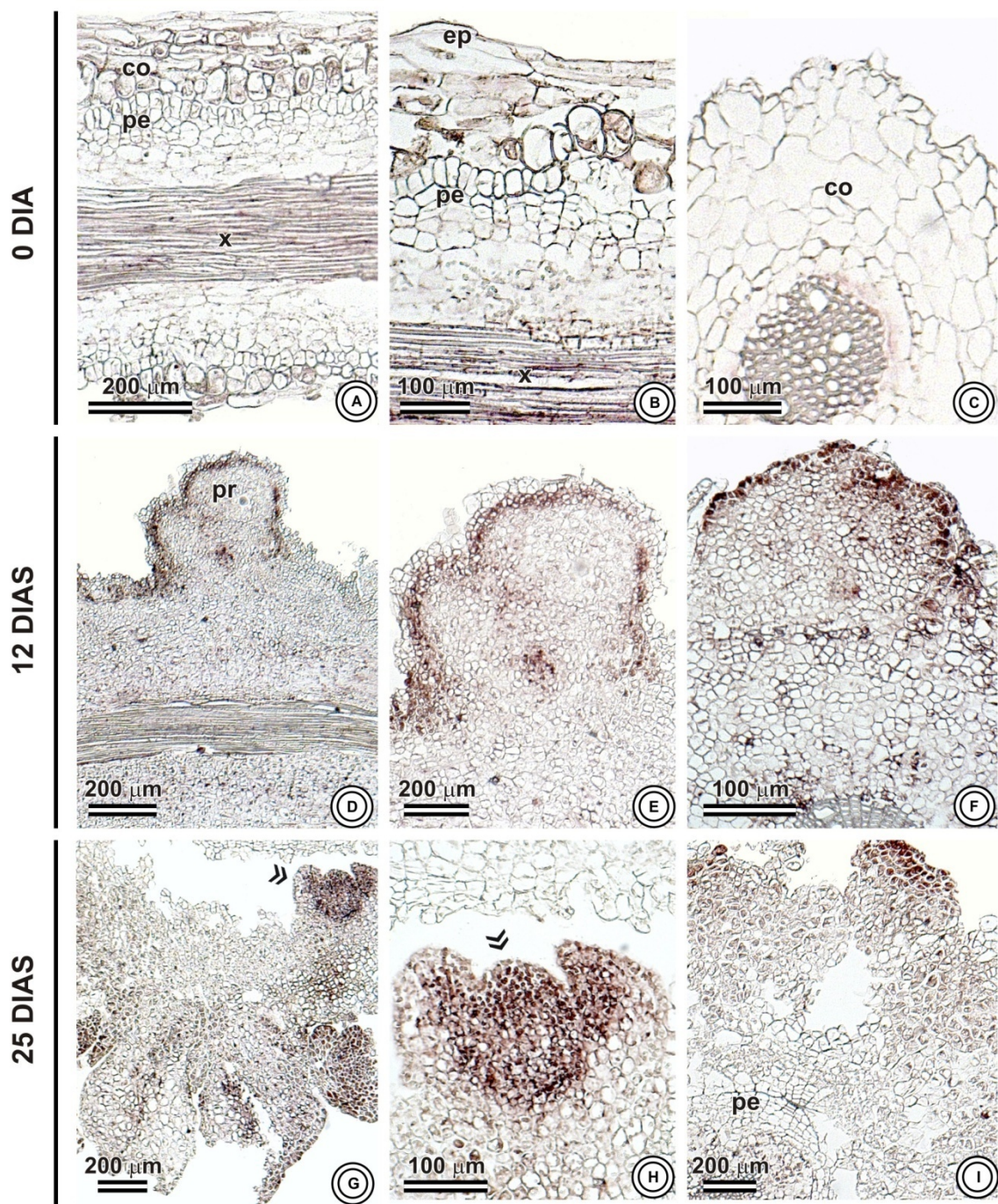
Durante o desenvolvimento dos cotilédones, a expressão do *AS1* marca as células subepidérmicas e depois é regulada negativamente pelo gene *STM* na formação do SAM, levando o *AS1* a se expressar apenas na região das células subepidérmicas, estando ausente na região central (Chandler et al., 2008). Li et al. (2005) relataram que é possível que o sinal de expressão mude no decorrer do desenvolvimento foliar e, por meio de hibridização *in situ* com diversas sondas, muitos experimentos revelaram que os sinais podem variar estando acumulados na parede celular ou no citoplasma de acordo com o estágio dos primórdios foliares. Sugere-se que, em trabalhos futuros, sejam realizados estudos em nível de microscopia confocal de varredura a laser para subsidiar a localização da expressão gênica, nos estádios de desenvolvimento de gemas avaliados na organogênese em raízes.

Os resultados do presente trabalho indicam que a caracterização da expressão do gene *PeAS1*, via hibridização *in situ*, se mostrou eficiente para análise molecular da regeneração de explantes radiculares em *Passiflora edulis*, iniciando-se aos 12 dias de cultivo. A abordagem de estádios mais tardios de desenvolvimento e outros genes relacionados a organogênese em raízes complementariam a compreensão desses processos.





**Figura 1:** Caracterização morfológica da organogênese *in vitro*, em explantes radiculares de *Passiflora edulis* Sims, em diferentes estádios de desenvolvimento. **A:** Segmentos radiculares utilizados como explantes iniciais (0 dia); **B:** Segmento de raiz após 12 dias em meio indutor de organogênese de ramos. Início da formação do meristemóides; **C-D:** Segmentos de raízes após 25 dias de cultivo em meio de indução. Surgimento do meristema apical caulinar e primórdios foliares. Barras: 1 mm.



**Figura 2:** Expressão do gene *PeAS1* durante a indução de organogênese *in vitro* em explantes radiculares em *Passiflora edulis* Sims, evidenciado por hibridização *in situ*. O precipitado escuro indica reação positiva à presença do gene. **A-C:** Cortes histológicos evidenciando segmentos radiculares utilizados como explantes iniciais; **D-F:** Explantes com 12 dias de cultivo em meio de indução. Início do desenvolvimento de protuberâncias, evidenciando a expressão do gene *PeAS1* nas células epidérmicas e subepidérmicas; **G, H:** Explantes com 25 dias de cultivo em meio de indução apresentando transcritos do *PeAS1* na região do meristema apical caulinar e primórdios foliares (ponta da seta). **I:** Expressão do gene *PeAS1* em meristemas que ainda não formaram os primórdios foliares. Legenda: **co:** córtex; **ep:** epiderme; **pe:** periciclo; **pr:** protuberância; **x:** xilema. Cortes transversais: C, F e I. Cortes longitudinais: A, B, D, E, G e H.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- 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**, v.57, p. 626-644, 2009.
- BECERRA, D. C.; FERNANDO, A. P.; GÓNGORA, G. G. 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**, v. 79, p. 87-90, 2004.
- BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P. Maracujá doce: melhoramento genético e germoplasma. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 601-616, 2005.
- BYRNE, M. E. Shoot development – genetic interactions in the meristem. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p.1499-1501, 2005.
- BYRNE, M. E.; BARLEY, R.; CURTIS, M.; ARROYO, J.M.; DUNHAM, M.; HUDSON, A.; MARTIENSSEN, R.A. *ASYMMETRIC LEAVES1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. **Nature**, v.408, p 967–971, 2000.
- BYRNE, M. E.; SIMOROWSKI, J.; MARTIENSSEN, R. A. *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*. **Development**, v. 129, p.1957-1965, 2002.
- CHANDLER, J.; NARDMANN, J.; WERR, W. Plant development revolves around axes. **Trends in Plant Science**, v.13, p. 78-84, 2008.
- DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D. M.; BARROS, R. S.; FLOH, E. L. S.; OTONI, W. C. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 199-208, 2009.
- DORNELAS, M. C.; AMARAL, W. A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. *EgLFY*, the *Eucalyptus grandis* homolog of the *Arabidopsis* gene *LEAFY* is expressed in reproductive and vegetative tissues. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 16; p.105-114, 2004.
- DORNELAS, M. C.; TSAI, S. M.; RODRIGUEZ, A. P. M. Expressed sequence tags of genes involved in the flowering process of *Passiflora* spp. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A (Ed.).



- Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology.** Global Science Books, Londres, p. 483-488, 2006.
- DORNELAS, M. C.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; KREIS, M. *Arabidopsis thaliana* SHAGGY related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. **Plant Journal**, v. 21, p.419-429, 2000.
- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.211-217, 1994.
- DORNELAS, M. C.; WITTICH, P.; VON RECKLINGHAUSEN, I.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; KREIS, M. Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. **Plant Molecular Biology**, v.39, p.137-147, 1999.
- FAMBRINI, M.; GIONINE, G.; CONTI, A.; MICHELOTTI, V.; PUGLIESI, C. Origin and development *in vitro* of shoot buds and somatic embryos from intact roots of *Helianthus annuus* X *H. tuberosus*. **Annals of Botany**, n.92; p. 145-151, 2003.
- 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**, v. 33, p. 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**, v. 91, p. 37– 44, 2007.
- FRIML, J.; VIETEN, A.; SAUER, M.; WEIJERS, D.; SCHWARZ, H.; HAMANN, T.; OFFRINGA, R.; JURGENS, G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. **Nature**, v. 426, p.147-153, 2003.
- FU, Y.; XU, L.; XU, B.; YANG, L.; LING, Q.; WANG, H.; HUANG, H. Genetic interactions between leaf polarity-controlling genes and *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 in *Arabidopsis* leaf patterning. **Plant Cell Physiology**, v. 48, p. 724–735, 2007.
- GAJ, M. D.; ZHANG, S.; HARADA, J. J. E.; LEMAUX, P. G. *LEAFY COTYLEDON* genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. **Planta**, v. 222, p. 977-988, 2005.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p.151-158, 1968.
- GUO, M.; THOMAS, J.; COLLINS, G.; TIMMERMANS, M. C. P. Direct repression of *KNOX* loci by the *ASYMMETRIC LEAVES1* complex of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 20, p.48-58, 2008.

- 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**, v. 48, p. 673–680, 2000.
- JENIK, P. D.; GILLMOR, C. S.; LUKOWITZ, W. Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.23, p. 207-236, 2007.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; ICUMA, I. M.; VERAS, M. C. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; DOS ANJOS, J. R. N. Cultura de Maracujazeiro. In: **Incentivo a Fruticultura no Distrito Federal: Manual de Fruticultura**. Brasília, COOLABORA, p. 42-53, 1999.
- LARANJEIRA, F. F. A fusariose do maracujá e a rede de pesquisa epidemiológica em fruteiras tropicais. In: BRUCKNER, C. H., MOTOIKE, S. Y., SIQUEIRA, L. D., SALOMÃO, L. C. C. (Eds). Reunião técnica da pesquisa em maracujá. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p, 169, 2002. **Anais...**
- LI, H.; XU, L.; WANG, H.; YAUN, Z., CAO, X.; YANG, Z.; ZHANG, D.; XU, Y.; HUANGA, H. The putative RNA-dependent RNA polymerase RDR6 acts synergistically with *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* to repress *BREVIPEDICELLUS* and microRNA165/166 in *Arabidopsis* leaf development. **The Plant Cell**,v.17, p. 2157–2171,2005.
- LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. 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**, v. 50, p. 239–247, 2007.
- MARTINS, F. T.; POLO, M. Desenvolvimento reprodutivo de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.: relação entre fotoperíodo, densidade celular meristemática e padrão de expressão de um ortólogo putativo do gene *LEAFY* de *Arabidopsis*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, p.131-142, 2009.
- MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-78, 2005.
- MELLO, M. O.; MELO, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of the callogenesis and organogenesis from root segments of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 197- 203, 2001.
- MENG, L.; ZHANG, S.; LEMAUX, P. G. Toward molecular understanding of *in vitro* in plant shoot organogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, p. 108-122, 2010.

- MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKASAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 571-573, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.
- NURMBERG, P. L.; KNOX, K. A.; YUN, B.; MORRIS, P. C.; SHAFIEI, R.; HUDSON, A.; LOAKE, G. J. The developmental selector *AS1* is an evolutionarily conserved regulator of the plant immune response. **PNAS**, v. 104, p. 18795- 18800, 2007.
- PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; CARNEIRO, L. A.; VALLS, J. F. M.; MANSUR, E. Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. and W. C. Gregory from roots and calluses derived from leaflets of *in vitro* plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 44, p. 14-17, 2008.
- PARK, S.; AHN, J.; LEE, W.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v. 168, p.1221-1225, 2005.
- PINTO, A. P.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p.28-33, 2010.
- REIS, L. B.; SILVA, M. L.; LIMA, A. B. P.; OLIVEIRA, M. L. P.; PINTO, D. L. P.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, v. 738, p. 425-431, 2007.
- RIBEIRO, L. M.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, S. R. M. DE.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; FONSECA, R. S.; VIEIRA, L. M. Organogênese *in vitro* em acessos de maracujazeiros amarelo infectados pelo vírus CABMV. **Unimontes Científica**, v. 8, p. 87-98, 2006.
- SÃO JOSÉ, A. R.; BRUCKNER, C. H.; MANICA, I.; HOFFMAN, M. **Maracujá: temas selecionados (1): melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia** In: Manica, I. (Ed), Porto Alegre, p. 72,1997.
- SILVA, C. V. Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis*. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 82, 2009.
- SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, p.179, 1997.

- SRINIVASAN, C.; LIU, Z.; HEIDMANN, I.; SUPENA, E. D. J.; FUKUOKA, H.; JOOSEN, R.; LAMBALK., ANGENENT, G.; SCORZA, R.; CUSTERS, J. B. M.; BOUTILIER, K. Heterologous expression of the *BABY BOOM AP2/ERF* transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Planta**, v. 225, p. 341-351, 2007.
- SUN, Y.; ZHOU, Q.; ZHANG, W.; FU, Z. *ASYMMETRIC LEAVES1*, an *Arabidopsis* gene that is involved in the control of cell differentiation in leaves. **Planta**, v. 214, p. 694-702, 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Crescimento e desenvolvimento. In: Taiz, L., Zeiger, E. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, RS: Artmed, 4<sup>a</sup> ed., p. 435-475, 2009.
- TAKADA, S.; HIBARA, K.; ISHIDA, T.; TASAKA, M. The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. **Development**, v. 128, p.1127-1135, 2001.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v. 62, p. 346-350, 2005.
- VILA, S.; GONZALEZ, A.; REY, H.; MROGINSKI, L. Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segments of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) seedlings. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, p. 746-751, 2005.
- VINOCUR, B.; CARMI, T.; ALTMAN, A.; ZIV, M. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1146-1154, 2000.
- WILKINSON, D. G. RNA detection using non-radioactive in situ hybridization. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 6, p. 20- 23, 1995.
- XIANG-CAN, Z.; JONES, D. A.; KERR, A. Regeneration of shoots on roots explants of flax. **Annals of Botany**, v. 63, p. 297-299, 1989.
- ZHANG, S.; WILLIAMS-CARRIER, R.; JACKSON, D.; LEMAUX, P. G. CDC2Zn and KN1 expression during adventitious shoot meristem formation from in vitro – proliferating axillary shoot meristem in maize and barley. **Planta**, v. 204, p. 542-549, 1998.

## CAPÍTULO II

---

### **ORGANOGENESE *in vitro* DE *Passiflora setacea* D.C (Passifloraceae): INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPLANTE, REGULADORES DE CRESCIMENTO E CONDIÇÃO DE INCUBAÇÃO**

#### **Resumo**

*Passiflora setacea* é usada para consumo *in natura*, como ornamental, como porta-enxerto para espécies comerciais e tem características com potencial para programas de melhoramento genético. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de organogênese *in vitro* e determinar a estabilidade genética de plantas oriundas de segmentos de folha, de hipocótilo e de raízes excisadas de plantas germinadas *in vitro*. Foram testados: três tipos de explantes (folha, hipocótilo e raiz), quatro composições de meio (1- MS +BA; 2 - MS +TDZ; 3- MS+ BA+TDZ, e 4 - MS) e dois regimes luminosos (16h de luz e escuro). Após 30 dias em meio de indução, foram avaliados o calejamento e o número de brotações nos explantes. Gemas diferenciadas foram transferidas para a fase de alongamento mediante o cultivo em meio MS acrescido de 2,88  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$ , durante 30 dias. Ramos alongados, com comprimento superior a 3 cm, e sem prévio enraizamento *in vitro*, foram aclimatizados gradativamente. Evidenciou-se organogênese direta e indireta nos explantes provenientes de hipocótilo e raiz, mas em explantes foliares, apenas a organogênese indireta foi observada. A presença de BA foi essencial para formação de brotos em explantes foliares, em ambas as condições de incubação. O meio suplementado por BA na luz proporcionou maior média de brotações em segmentos de hipocótilo. Explantes radiculares apresentaram maior número de brotações quando cultivados em meio com BA+TDZ na luz. Não foi possível a conversão de explantes foliares em ramos alongados. Todavia, houve maior número de brotos alongados em explantes hipocotiledonares e radiculares quando cultivados em meio com BA+TDZ sob luz. A organogênese em hipocótilo foi verificada pela formação de meristemóides, que posteriormente se diferenciaram em gemas apicais caulinares ou primórdios foliares, em raiz foi verificada organogênese direta. A análise de citometria de fluxo constatou aumento na quantidade média de DNA nuclear em dois de cinco regenerantes analisados oriundos de explantes radiculares cultivados em meio MS adicionado de BA+TDZ, quando comparado ao material oriundo de



sementes. A mesma condição de meio e de ambiente não induziu poliploidia em regenerantes oriundos de explantes hipocotiledonares. Conclui-se que o tipo de explante, a adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo e as condições de incubação tiveram influência na morfogênese *in vitro* de *Passiflora setacea*.

**Palavras chave:** *Passiflora setacea*, organogênese, citocininas, citometria de fluxo, estabilidade genética.

## 1. INTRODUÇÃO

*Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae), espécie silvestre conhecida como “maracujá-sururuca” ou “maracujazeiro-do-sono”, é nativa do Cerrado, mas pode ser encontrado na Caatinga ou em áreas de transição como o semi-árido e norte - mineiro (Meletti et al., 2002). Além da produção de frutos saborosos, muito utilizados no consumo *in natura* e para a fabricação de doces (Oliveira e Ruggiero, 2005), e sua utilização como ornamental, devido às características de suas flores (Araújo, 2007), a espécie ainda apresenta características que indicam seu potencial para uso em programas de melhoramento genético, assim como em porta-enxerto para espécies comerciais (Menezes et al., 1994).

Análises histoquímicas em folhas de *P. setacea* detectaram compostos secundários como taninos e alcalóides, comuns a espécies de *Passiflora*, que apresentam potencial para obtenção desses compostos e utilização como planta medicinal (Pereira et al., 2008). Esta espécie constitui, ainda, excelente fonte de resistência genética a alguns patógenos que acometem a cultura de maracujazeiros (Oliveira, 1987; Oliveira e Ferreira, 1991; Braga et al., 2006).

A desuniformidade da germinação das sementes que apresentam dormência de até dois anos (Meletti et al., 2002) e a dificuldade de enraizamento de estacas pode comprometer a sua produção em escala comercial (Manica et al., 2005). Assim, as técnicas de cultura de tecidos são alternativas para a sua propagação (Santos et al., 2010).

Protocolos de cultura de tecidos de espécies de *Passiflora* visam a obtenção de plantas livres de doenças, a produção em grande escala, e o fornecimento de materiais para programas de melhoramento (Passos e Bernacci 2005). Os protocolos de organogênese *in vitro*, já descritos para o gênero, expressivamente estudado na espécie *P. edulis*, se baseiam no tipo de explante utilizado, na composição do meio basal, na adição de citocininas com ou sem combinação com auxinas, acréscimo de agentes inibidores de etileno, na condição de incubação, entre outros (Drew, 1991; Dornelas e Vieira, 1994; Faria e Segura, 1997; Biasi et al., 2000; Hall et al., 2000; Becerra et al.,

2004; Trevisan e Mendes, 2005; Ribeiro et al., 2006; Fernando et al., 2007; Lombardi et al., 2007; Dias et al., 2009; Garcia et al., 2010; Pinto et al., 2010).

As citocininas são responsáveis pela divisão celular e estimulam a iniciação, o crescimento e o desenvolvimento de gemas adventícias, sendo a 6-Benzilaminopurina (BA), a citocinina mais utilizada para indução de brotações (Beyl, 2000). O emprego de citocininas como (BA) e Tidiazuron (TDZ) em *Passiflora* têm apresentado resultados favoráveis (Trevisan e Mendes, 2005; Fernando et al., 2007; Garcia et al., 2010). A eficiência do processo organogênico em *P. alata* foi evidenciada em explantes hipocotiledonares cultivados em meio acrescido com BA ou TDZ e nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) sob fotoperíodo (16h/luz) (Pinto et al., 2010).

Diversos tipos de órgãos podem ser utilizados como explantes para indução de organogênese *in vitro*, entretanto, o nível de diferenciação e a finalidade da micropropagação devem ser examinados. Em geral, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia et al., 1991; Grattapaglia e Machado, 1998). Contudo, o potencial propagativo depende da procedência do explante e da espécie estudada (Apezzato-da-Glória et al., 1999).

A instabilidade genética, comumente observada em plantas cultivadas e mantidas *in vitro* durante períodos prolongados, pode representar limitação na propagação massal de plantas e na transformação genética (Larkin e Scowcroft, 1981; Evans et al., 1984). O emprego de técnicas para avaliar e monitorar a estabilidade genética de plantas cultivadas *in vitro* é desejável e, com esta finalidade, análises de citometria de fluxo são utilizadas na detecção de variações de ploidia (Winkelmann et al., 1998; Doležel et al., 2007a; Loureiro e Santos, 2010). Para o gênero *Passiflora*, a utilização da citometria de fluxo em trabalhos envolvendo culturas de tecidos foi relatada por Otoni et al. (1995), Silva (2009) e Paim-Pinto et al. (2010).

Até o momento, não foram encontrados na literatura, trabalhos que noticiem a regeneração *in vitro* e a avaliação da estabilidade genética de regenerantes de *P. setacea*. Devido às características inerentes a essa espécie à sua aplicação como porta-enxerto e à resistência genética a morte precoce de plantas, tolerante a bacteriose, antracnose, verrugose (Oliveira e Ruggiero, 2005), bem como a dificuldade de propagação via seminífera, faz-se necessário a investigação de protocolos para regeneração *in vitro* dessa espécie. O estabelecimento de culturas *in vitro* pode, ainda,

representar maneiras alternativas de multiplicação, contribuição em programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma de espécies silvestres, como *P. setacea*.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tipo de explante, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura e condições de incubação na organogênese *in vitro* de *P. setacea* e determinar a estabilidade genética de seus regenerantes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

Sementes de frutos maduros de *Passiflora setacea* D.C (Passifloraceae) provenientes de populações naturais da região de Janaúba, localizada no Norte de Minas Gerais, foram lavadas em água corrente para retirada do arilo. Estas foram colocadas sobre papel absorvente e secas à sombra em temperatura ambiente por cerca de três dias e o arilo restante foi retirado manualmente.

Com auxílio de uma mini-morsa foram retirados os tegumentos das sementes segundo protocolo de Reis et al. (2007). Para assepsia as sementes sem tegumento foram embebidas em etanol 70 % (v/v) por um minuto, seguidas por imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,5 % v/v) com duas gotas de Tween-20 a 0,1 % (v/v), durante 15 minutos. Logo após foi feito tríplice lavagem em água desionizada estéril.

Cerca de 10 sementes sem tegumento foram transferidas para frascos de vidro (250 mL de capacidade) contendo aproximadamente 50 mL de meio de cultura composto por sais MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 1,5 % (p/v) de sacarose e 0,005 (p/v) de mio-inositol. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,8 e acrescido de 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), sendo autoclavado a 120° C, 1,1 Pa por 20 min.

A germinação das sementes ocorreu no escuro, sendo que após 15 dias de inoculação, as plântulas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (lâmpadas fluorescentes, luz do dia especial, 20W, Osram, Brasil) e temperatura de 27 ± 2 °C.

### 2.2. Organogênese *in vitro*

Segmentos de raiz e hipocótilo (com 10 mm de comprimento) e folha (10 x 10 mm com nervura mediana) foram coletados a partir de plântulas germinadas *in vitro* e utilizados como explante. Esses foram dispostos horizontalmente sobre a superfície do meio de cultura vertido em placas de Petri (90 x 15 mm) de poliestireno cristal. Os segmentos foliares foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de

cultura. O meio continha sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 3 % (p/v) de sacarose e 0,01% (p/v) de mio-inositol e suplementados com 6-Benzilaminopurina (BA) a 4,43  $\mu\text{M}$ , Tidiazuron (TDZ) a 2,27  $\mu\text{M}$ , BA (4,43  $\mu\text{M}$ ) + TDZ (2,27  $\mu\text{M}$ ) e o meio MS sem reguladores de crescimento (tratamento controle). Em todos os tratamentos, foi adicionado como agente geleificante 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA). O pH foi ajustado para 5,8 e os meios, autoclavados a 120° C, 1,1 Pa por 20 min.

As culturas foram incubadas a 27 °C sob fotoperíodo de 16 horas (36  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ou no escuro (placas cobertas com papel alumínio). A avaliação foi realizada quatro semanas após o período de indução e com o auxílio de estereomicroscópio (Modelo Olympus SZX7, Olympus Optical, Japão) foi determinado o calejamento e o número brotações nos explantes.

### **2.3. Alongamento e aclimatização**

Para induzir o alongamento, estruturas regeneradas (brotos com folhas de 0,5-1,0 cm de comprimento), foram transferidos para frascos (capacidade de 250 mL) que continham aproximadamente 40 mL de meio MS acrescido de 2,88  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), suplementado com vitamina B5, 3 % (p/v) de sacarose, 0,01% (p/v) de mio-inositol e 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), com ajuste do pH para 5,8 e autoclavado a 120° C, 1,1 Pa, por 20 min. Os frascos contendo quatro estruturas regeneradas foram vedados com tampas plásticas transparentes e mantidos sob 27 °C e fotoperíodo de 16 h de luz. A avaliação ocorreu quatro semanas após a incubação, determinando-se o número de brotos alongados. As brotações com comprimento superior a 3 cm tiveram a porção proximal dos caules imersa em ácido indolbutírico (AIB - 1 mg L<sup>-1</sup>) durante 10 segundos para indução de raízes. Foram transferidas individualmente para copos plásticos contendo mistura de substrato comercial Plantmax® (Eucatex) e fibra de casca de coco (1:1) e gradativamente aclimatizadas.

### **2.4. Análise anatômica**

Para avaliar anatomicamente o processo de regeneração *in vitro* foi feita a coleta de segmentos de folhas, hipocótilos e raízes após 30 dias de cultivo em meio de indução e as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Em seguida, foram desidratados em série etílica e incluídos em resina acrílica (Historesin Leica). Após microtomia a 7µm, os cortes transversais e longitudinais foram corados com azul de Toluidina a 0,05%, pH 4,8, (O' Brien e McCully, 1981) por 10 minutos, e as lâminas permanentes foram montadas em Permount. A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) localizado no laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

## **2.5. Análises de citometria de fluxo**

A estabilidade genética de plantas regeneradas a partir de hipocótilos e raízes, cultivados sob regime luminoso de 16 h, e aclimatizadas foram avaliadas por citometria de fluxo. Aproximadamente 20 a 30 mg de folhas frescas, de cinco indivíduos regenerados de cada explante, foram fragmentadas em pequenos pedaços na presença de 1 mL de tampão LB01 para liberação de núcleos (Doležel e Bartos, 2005). Como padrão de referência interna foi utilizado *Glycine max* 'Polanka', com conteúdo 2C de DNA de 2,50 pg (Doležel et al., 2007a, 2007b). Os tecidos previamente cortados foram aspirados através de duas camadas de tela metálica com uma pipeta plástica, filtrados por uma membrana de náilon de 50 µm e coletados em um tubo de poliestireno.

A suspensão de núcleos foi corada com 25 µL de solução de iodeto de propídio (1mg mL<sup>-1</sup>, Sigma Chemical Company, USA), sendo adicionados 5 µL de RNase (Amresco, USA) para cada amostra. Essas foram armazenadas a 4° C no escuro e analisadas 1-2 horas depois. Para cada amostra, foram analisados no mínimo 10.000 núcleos com o uso de um visor de escala logarítmica. Foi utilizado o citômetro de fluxo Becton-Dickinson (Facs Calibur) para realização das análises, e cada histograma citométrico produzido foi documentado pelo software *Cell Quest* e analisado pelo software livre WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Amostra (2C DNA)} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra} \times 2,50 \text{ pg (conteúdo de DNA de } G. \text{max)}}{\text{Canal do pico G1 de } G. \text{Max}}$$

## 2.6. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial de 2x4, com cinco repetições. Cada repetição constitui de uma placa de Petri contendo 10 explantes, totalizando 50 explantes por tratamento.

Os dados percentuais coletados foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e, quando constatada distribuição não normal dos dados ( $p < 0,05$ ), esses foram transformados no arco seno da raiz quadrada de  $x/100$ . Em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando constatada diferenças entre os tratamentos pelo teste F, foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi realizada análise de variância (ANOVA) para observar o efeito do tratamento e do tipo de explante na variação da ploidia de plantas submetidas à citometria de fluxo. Para realização das análises, foi utilizado o software SAS (SAS Institute, 2004).



### 3. RESULTADOS

Nas condições experimentais do presente trabalho foi observado que, dependendo do tipo de explante e do meio de cultura utilizado, houve a conversão de brotos alongados em plantas. A figura 1 apresenta a caracterização morfológica (A-C), caracterização anatômica (D-F), fase de alongamento dos brotos (G), e aclimatização (H-I), durante a organogênese *in vitro* em *P. setacea*. As Tabelas 1, 2, e 3 apresentam os resultados deste processo a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares, respectivamente, sob 16 horas de luz e escuro. A Tabela 4 apresenta a porcentagem de brotos alongados.

Quanto à formação de calos em explantes foliares, todos os tratamentos foram eficientes na indução de calejamento, exceto, o meio MS que sob 16 h de luz não promoveu formação de calos nesses explantes (Tab. 1).

Os tratamentos BA, sob 16 h de luz, e BA+TDZ, no escuro, proporcionaram maior média de brotações em explantes foliares. Nesses explantes não foi verificada formação de brotos quando cultivados na ausência de BA (Tab. 1).

Em segmentos de hipocótilo, não foram constatadas diferenças significativas para os tratamentos, independente da composição do meio de cultura utilizado e da condição de incubação, quanto à formação de calos (Tab. 2).

Houve maior média de brotações em explantes hipocotiledonares quando cultivados em meio suplementado com BA sob 16 horas de luz apesar de, não diferir estatisticamente dos meios com BA+TDZ sob 16 h de luz e no escuro (Tab. 2).

Para explantes derivados de segmentos de raízes, dentre os tratamentos avaliados, o meio MS apresentou menor formação de calos no escuro (Tab. 3).

Evidenciou-se maior média de brotações em segmentos radiculares quando cultivados em meio suplementado com BA+TDZ sob 16 h de luz (Tab. 3).

Foram identificados os explantes que apresentaram estruturas como gemas caulinares e transferidos para meio de alongamento por 30 dias (Fig. 1G). Em segmentos de folha não ocorreu à conversão de gemas caulinares em ramos alongados. Explantes hipocotiledonares e radiculares apresentaram maior média de gemas alongadas, brotos com tamanho igual ou superior a 3 cm, quando cultivados em meio com BA+TDZ na luz. No entanto não diferiram estatisticamente do meio com BA na luz (Tab. 4). Todas as

brotações alongadas provenientes de raiz e hipocótilo, depois de aclimatizadas (Fig. 1H-I), apresentaram raízes.

Foi observada organogênese direta (Fig. 1B-C, D-F) e indireta em explantes hipocotiledonares e radiculares. Evidenciou-se em explantes hipocotiledonares a formação de meristemóides, que possivelmente, dariam origem as brotações ou apenas a formação de primórdios foliares sem o meristema apical caulinar (Fig. 1E). Em explantes foliares foi observado formação de gemas caulinares e primórdios foliares após 30 dias em meio de indução e intensa proliferação de calos na periferia do explante (Fig. 1A). A organogênese indireta é assincrônica apresentando sobre o mesmo explante brotações em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 1D).

Análises de citometria de fluxo realizadas com amostras foliares de plantas regeneradas de cada tratamento a partir de explantes hipocotiledonares e radiculares e plantas de origem seminífera também germinadas *in vitro*, foram utilizadas para comparações na estabilidade do nível de ploidia das plantas regeneradas. Não houve a conversão de explantes foliares em plantas para análise de citometria de fluxo, portanto seus dados não foram apresentados.

Os picos de leitura da quantidade de DNA em G<sub>1</sub> resultaram em histogramas com resolução adequada para determinar a ploidia das plantas analisadas. Pela citometria de fluxo foram observadas duas plantas, de um total de cinco analisadas, que apresentaram quantidade de DNA duplicada (4C) comparativamente a plantas diplóides do tratamento controle (3,27pg). A poliploidia foi identificada em plantas regeneradas a partir de explantes radiculares, ambas oriundas do meio com a combinação de reguladores BA+TDZ (Tab. 5 e Fig. 2). Também foi observado que, de cinco repetições, uma planta oriunda de explantes radiculares no meio MS e três plantas regeneradas a partir de explantes hipocotiledonares no meio com BA apresentaram quantidades de DNA para as células em G<sub>1</sub>, inferiores ao controle. Os demais regenerantes originados de explantes radiculares e hipocotiledonares sob os diferentes tratamentos, apresentaram média da quantidade de DNA semelhante ao controle, sendo, portanto, indivíduos diplóides (Tab. 4). A análise de variância das médias da quantidade de DNA nuclear foi significativa para variação da ploidia das plantas regeneradas, apenas quando houve interação dos fatores explante\*tratamento (p=0,016). Explantes radiculares quando cultivados no meio com BA+TDZ apresentaram maior média da quantidade de DNA em relação aos outros meios e explantes avaliados (Tab. 5).

#### 4. DISCUSSÃO

Foram avaliados, neste trabalho, diferentes parâmetros que caracterizam a morfogênese *in vitro* de *Passiflora setacea* a partir de explantes juvenis obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Muitos autores têm relatado a organogênese *in vitro* para diversas espécies do gênero *Passiflora*, baseados na adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, no tipo de explantes (Dornelas e Vieira, 1994; Monteiro et al., 2000; Faria et al., 2007; Alexandre et al., 2009; Pinto et al., 2010), e condições de luminosidade (Apezatto-da-Glória et al., 1999; Garcia et al., 2010; Pinto et al., 2010).

A relação entre a competência morfogênica e o regime de luz tem sido discutida na literatura. A influência da intensidade de luz na qualidade de calos e regeneração de gemas foi observada por Moreira-Dias et al. (2000) em *Citrus*. Para *Passiflora*, embora a maioria dos autores tenha relatado ausência de indução de brotações no escuro em *P. edulis* (Moran-Robles, 1979; Apezatto-da-Glória et al., 1999), *P. suberosa* (Garcia et al., 2010) e *P. alata* (Pinto et al., 2010), neste trabalho, foi observado o surgimento de brotações, em todos os tipos explantes testados, quando mantidos no escuro.

No gênero *Passiflora*, a utilização de citocininas para indução de gemas é bem estabelecida, e o balanço hormonal necessário para a diferenciação do processo depende da quantidade de auxina endógena nos diferentes tecidos (Dornelas e Vieira, 1994; Lombardi et al., 2007). A adição de 4,43  $\mu\text{M}$  de BA foi indispensável para formação de brotos em explantes foliares de *P. setacea*. Os resultados do presente trabalho se assemelham ao observado para discos foliares em *P. molissima*, *P. gilberti*, *P. maliformis* e *P. amethystina* cultivados em meio MS suplementado por 4,43  $\mu\text{M}$  de BA (Dornelas e Vieira, 1994).

Para *P. edulis*, Apezatto-da-Glória et al. (1999) e Alexandre et al. (2009) relataram que a concentração de 4,43  $\mu\text{M}$  de BA na presença de luz foram essenciais para formação de gemas em explantes foliares. No presente trabalho, foi verificado que a presença de BA sob luz ou escuro promoveram a formação de brotações nestes explantes.

O TDZ possui alta atividade citocinínica em meios de cultivos, quando utilizados em pequenas concentrações (Graça et al., 2001), e promove maior formação de brotos quando comparado a citocininas do tipo das adeninas, em particular BA e Cinetina

(D'Onofrio e Morini 2005; Khurana-Kaul et al. 2010). Em *Passiflora edulis* foi observada a formação de estruturas organogênicas em segmentos de hipocótilo quando cultivados em meio com TDZ, entretanto essas rotas dependem da concentração desta citocinina (Felismino, 2005). A combinação de BA e TDZ durante a organogênese *in vitro* em *Lens culinares* (lentilha) promoveram a formação de múltiplas gemas, sendo eficiente o uso desses reguladores em protocolos de regeneração (Fratini e Ruriz, 2002). No presente trabalho, em hipocótilo, a presença de BA e BA+TDZ foi eficiente para aumentar a formação de gemas caulinares, ainda que dependente do regime de luz. Para explantes radiculares, a combinação de BA+TDZ sob influência da luz proporcionou o maior número de brotações quando comparado aos demais tratamentos. Em contraste, para *P. alata* a presença de BA+TDZ no meio de cultivo não diferiu dos demais meios utilizados, quando comparado o número de brotações no hipocótilo (Pinto et al., 2010) e apenas a formação de calos não morfogênicos foi observado em explantes foliares de *P. suberosa* quando utilizado TDZ (Garcia et al., 2010).

Evidenciou-se, neste trabalho, que a organogênese em explantes foliares em *P. setacea* ocorre de forma indireta. De maneira similar Monteiro et al. (2000), descreveram a regeneração *in vitro* de plantas de *P. suberosa*, a partir de discos foliares, com formação de calos com aspecto organogênico na periferia desses explantes cultivados em meio MS suplementado com 2,22  $\mu\text{M}$  e 4,44  $\mu\text{M}$  de BA. Resultados antagônicos, descritos como organogênese direta, foram relatados para *P. edulis* (Apezzato-da-Glória et al., 1999; Fernando et al., 2007) e *P. molissima*, *P. gilberti*, *P. maliformis* e *P. amethystina* (Dornelas e Vieira, 1994).

Em *P. setacea*, os segmentos de hipocótilo e raiz apresentaram organogênese direta e indireta. Esse padrão organogênico foi descrito de maneira semelhante em hipocótilo de *P. edulis* (Fernando et al., 2007). Os explantes hipocotiledonares de *P. setacea* apresentaram meristemóides e, segundo Lombardi et al. (2007), estes podem dar origem aos primórdios foliares ou continuarem dividindo formando as protuberâncias. Observações estruturais mostraram que a formação desses centros meristemáticos, envolvidos no processo de regeneração, têm diferentes origens, variando de acordo o tipo de explante e estágio de desenvolvimento (Biasi et al., 2000). O padrão direto e indireto de organogênese em raízes também foi relatado em *P. cincinnata* por Lombardi et al. (2007). Os autores evidenciaram, por meio de análises histológicas, a conexão vascular existente entre os brotos e os explantes de raiz. Silva

(2009) observou organogênese direta, com formação de gemas em explantes radiculares de *P. cincinnata* Mast. e três populações de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., cultivados em meio MS suplementado com 4,43  $\mu$ M de BA.

No presente estudo, o alongamento dos brotos inoculados em meio MS suplementado com GA<sub>3</sub> foi dependente do meio de origem dos mesmos (Tab. 4). O (GA<sub>3</sub>) é um hormônio que atua nas plantas estimulando o crescimento, em consequência da sua ação na divisão e expansão celular (Taiz e Zeiger, 2009). O alongamento de brotos em *P. setacea* foi influenciado pelo tipo de explante, pela adição de fitohormônios ao meio e condições de incubação associada ao acréscimo de GA<sub>3</sub> ao meio. Pinto et al. (2010) observaram que o acréscimo de GA<sub>3</sub> ao meio MS não se mostrou eficiente no alongamento de gemas caulinares em *P. alata*. Entretanto, Nuth et al. (2007) relataram que maiores concentrações de GA<sub>3</sub> no meio proporcionaram melhor alongamento e desenvolvimento de brotos em *P. edulis*.

Durante a fase de aclimatização de ramos em *P. setacea* a totalidade de plantas transferidas para mistura de substrato comercial e fibra de coco que não apresentavam raízes, desenvolveram-nas durante a aclimatização *ex vitro*. O sucesso da aclimatização de ramos alongados e não enraizados foi observada em *Passiflora* sp. (Freitas, 1997; Ribas et al., 2002). Os autores sugeriram que não é essencial a pré-formação de raízes na fase de aclimatização para garantir a sobrevivência e desenvolvimento das plantas. Em algumas espécies lenhosas, a exemplo de *Eucalyptus*, a prática de enraizamento *ex vitro* das microestacas é rotineira, ainda que dependente de fatores como o genótipo (Xavier et al., 2009).

Para *P. setacea*, não foram reportados estudos sobre a estabilidade genética de culturas organogênicas e das plantas convertidas por esse processo. Neste trabalho, avaliou-se a variação na ploidia de plantas desta espécie, regeneradas sob diferentes combinações de reguladores de crescimento. Pela citometria de fluxo estimou-se em 3,27 pg o conteúdo 2C de DNA nuclear de plantas-controle, germinadas *in vitro*. Considerando-se que a espécie é diplóide ( $2n = 2x = 18$ ) (Cuco et al., 2005) e que 1pg equivale a 980 Mpb (Bennet et al., 2000), o DNA nuclear das plantas de origem seminífera de *P. setacea* equivale a um tamanho de genoma (2C) de 3195 Mpb. Algumas espécies do gênero *Passiflora* têm o conteúdo 2C de DNA oscilando entre 1,83-5,86 pg e o tamanho do genoma entre 896-5253 Mpb (Souza et al., 2004). Estimou-se que o conteúdo de DNA nuclear para plantas de *P. cincinnata*, oriundas da germinação de

sementes, seja de 3,01 pg (Paim-Pinto et al., 2010). O conteúdo de 2C de DNA em *P. setacea* apresenta valores intermediários aos encontrados para outras espécies de passifloráceas.

Destaca-se que em *P. setacea* foi observada a ocorrência de poliploidia em regenerantes oriundos de explantes radiculares cultivados em meio suplementado com BA+TDZ. O aumento de ploidia observado pode ter ocorrido pelo efeito sinérgico do meio com citocininas com os explantes radiculares. Silva (2009) verificou estabilidade genética mediante a avaliação da quantidade de DNA em regenerantes oriundos de explantes radiculares de *P. cincinnata* e em três populações de *P. edulis* (FB100, FB200 e FB 300). Todavia, diferentemente do presente estudo, o meio indutor continha apenas BA. Plantas de *P. cincinnata* regeneradas por organogênese *in vitro* apresentaram pequena variação no conteúdo 2C de DNA nuclear, oscilando de 2,96 a 3,01 pg.

A utilização de TDZ, em combinação com BA, foi recentemente proposta para a indução de organogênese em explantes foliares e hipocotiledonares de *P. alata* (Pinto et al., 2010). Outros trabalhos já avaliaram a ação isolada dessa citocinina no gênero *Passiflora* (Monteiro, 2000; Felismino, 2005; Garcia et al., 2010). Em hipocótilos de *Bixa orellana*, sob influência de TDZ, evidenciou-se a formação de multibrotações com intensas divisões mitóticas, resultando na formação de zonas de proliferação localizadas próximas à epiderme e ao tecido cortical periférico (Paiva-Neto et al., 2003). Felismino (2005) avaliou o emprego isolado desses dois reguladores e relatou que o TDZ induziu intensa atividade mitótica em ambos extremos dos explantes, gerando típica assincronia na regeneração de estruturas. No presente trabalho, possivelmente, o efeito sinérgico entre os dois reguladores, BA e TDZ, potencializou as divisões celulares nos segmentos de raízes.

Uma hipótese para explicar porque os regenerantes de explantes radiculares cultivados em meio com BA+TDZ apresentaram poliploidia enquanto os explantes de hipocótilo, nas mesmas condições de cultivo, não tiveram a estabilidade genética alterada, pode estar relacionada à responsividade celular durante a formação das novas gemas caulinares. Já que a organogênese direta em raiz em *P. setacea* foi observada a partir de divisões das células do periciclo (dados não apresentados), a alta responsividade desse tecido pode estar relacionada à capacidade dessas células de reterem a expressão de genes no ciclo celular, como o *CDC2a* (Hemerley et al., 1993; Martinez et al., 1992) e o *CYCA2* (Burssens et al., 2000). Provavelmente, esses genes

seriam responsáveis pela capacidade de células do periciclo entrar novamente no ciclo celular rapidamente sem sofrer real desdiferenciação (Atta et al., 2009). Essa característica do periciclo, possivelmente, estaria relacionada à endoreduplicações em determinados setores celulares, culminando, em alguns casos, na diferenciação de gemas a partir desses grupos de células, o que poderia ter induzido a poliploidia apenas em raízes de *P. setacea*. No entanto, as razões pelas quais houve maior predisposição de indução de poliploidia em explantes radiculares comparativamente aos hipocotiledonares ainda permanecem pouco claras.

O meio com BA+TDZ seria indicado para os protocolos que atendam à finalidade de se gerar poliplóides em *P. setacea*, entretanto, não recomendável para trabalhos que visem à clonagem. Sistemas eficientes de regeneração *in vitro* fornecem alternativas para manipular a ploidia e, assim, ampliar as possibilidades de melhorar suas características ornamentais em espécies de interesse (Meyer et al., 2009). O aumento da ploidia para algumas espécies, como orquídeas, pode ser benéfico uma vez que o aumento da variabilidade genética proporciona flores com cor e aroma mais intenso, elevando seu valor comercial (Vichiato, 2005). Além disso, plantas poliplóides têm maior capacidade de ocupar diferentes ambientes e podem ter maior taxa de recombinação genética, seletivamente mais interessante (Doerner, 2000), dentre outras características importantes, como maior vigor, resistência a pragas e doenças, tolerância ao estresse e proteção contra mutações deletérias (Comai, 2005; Ranney, 2006). Destaca-se, aqui, o interesse crescente por passifloráceas com importância ornamental (Abreu et al., 2009), e sua propagação por técnicas de cultivo *in vitro* (Braglia et al., 2010). Assim, o emprego dessa técnica, combinando os reguladores de crescimento BA e TDZ, poderia oferecer benefícios aos melhoristas como alternativa para gerar variabilidade, mediante a obtenção de poliplóides em passifloráceas.

Dado o exposto, pode-se concluir que os explantes de *P. setacea* cultivados *in vitro* respondem de forma diferenciada, de acordo o tipo de explante utilizado, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura e a condição de incubação. Sugere-se que nos protocolos de organogênese *in vitro* de *P. setacea* sejam empregados explantes hipocotiledonares cultivados em meio com adição de BA na luz promovendo, assim, melhor eficiência de respostas organogênicas.

Os resultados, inéditos para a espécie, mostraram variação na estabilidade genética, poliploidia, em explantes radiculares cultivados em meio acrescido de BA+TDZ.

Esses resultados, possivelmente, seriam úteis para indução de indivíduos poliplóides com benefícios citados anteriormente, no entanto, não são aconselháveis para trabalhos que envolvam técnicas de clonagem.



**Tabela 1.** Taxas de calejamento e número de brotações em explantes foliares de *Passiflora setacea* em diferentes meios de cultura sob 16 h de luz ou escuro.

Meios de cultura	Calejamento (%)		Brotações (%)	
	16 h Luz	Escuro	16 h Luz	Escuro
BA	70,0 ± 14,1 a*	78,0 ± 17,8 a	48,0 ± 24,8 a	18,0 ± 10,0 ab
TDZ	36,0 ± 15,1 a	60,0 ± 35,0 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
BA + TDZ	53,0 ± 8,3 a	58,0 ± 28,6 a	20,0 ± 7,7 ab	50,0 ± 36,0 a
MS	0,0 ± 0,0 b	42,0 ± 32,6 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si, a  $P \leq 0,05$ . \*Média ± SE.

**Tabela 2.** Taxas de calejamento e número de brotações em explantes hipocotiledonares de *Passiflora setacea* em diferentes meios de cultura sob 16 h de luz ou escuro.

Meios de cultura	Calejamento (%)		Brotações (%)	
	16 h Luz	Escuro	16 h Luz	Escuro
BA	100,0 ± 0,0 a*	100,0 ± 0,0 a	92,0 ± 17,8 a	48,0 ± 22,8 b
TDZ	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	63,0 ± 8,3 b	5,0 ± 5,0 c
BA + TDZ	79,0 ± 38,7 a	100,0 ± 0,0 a	85,0 ± 5,0 ab	62,6 ± 38,4 ab
MS	90,0 ± 4,47 a	100,0 ± 0,0 a	46,0 ± 13,4 b	48,0 ± 13,0 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si, a  $P \leq 0,05$ . \* Média ± SE.

**Tabela 3.** Taxas de calejamento e número de brotações em explantes radiculares de *Passiflora setacea* em diferentes meios de cultura sob 16 h de luz ou escuro.

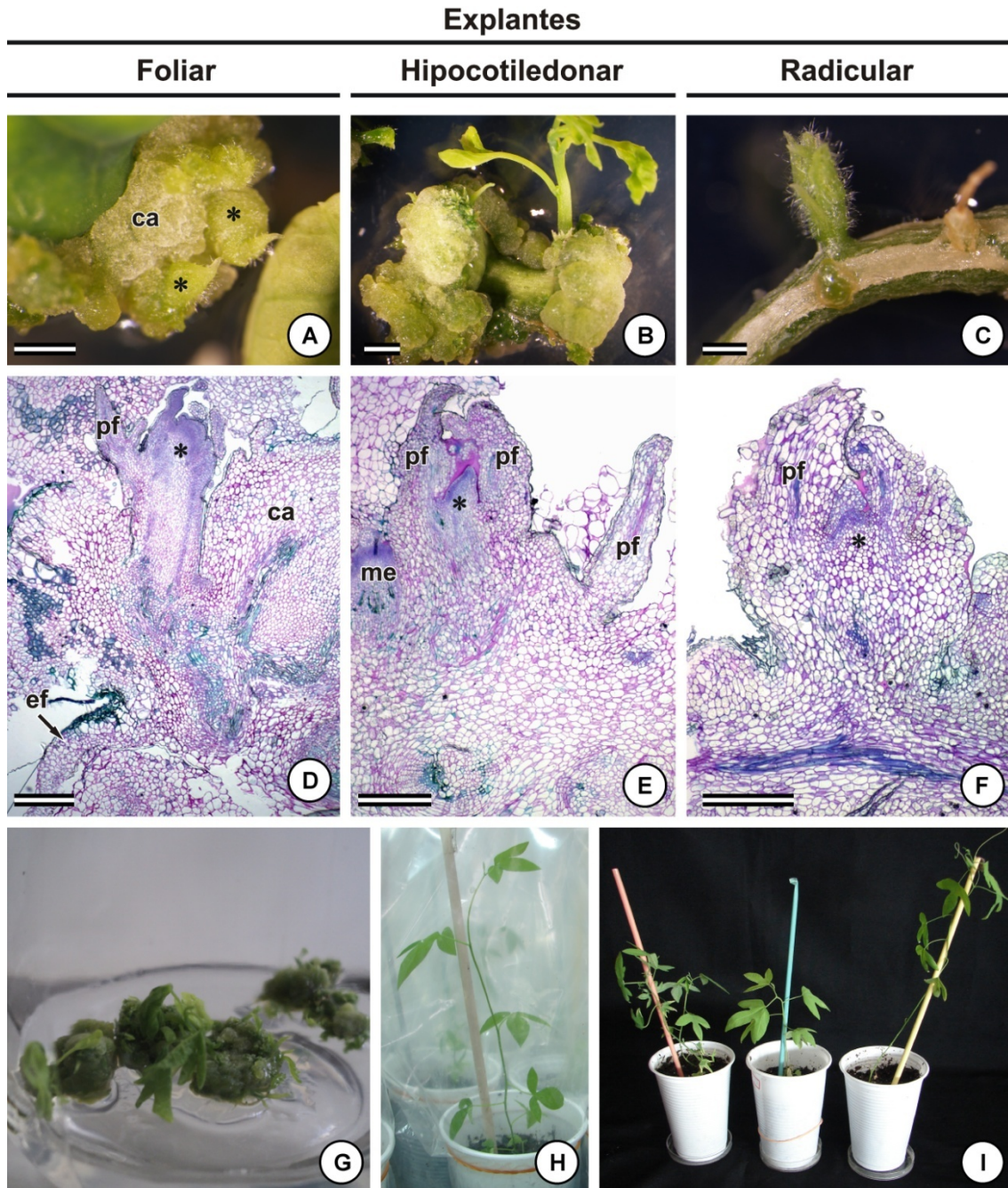
Meios de cultura	Calejamento (%)		Brotações (%)	
	16 h Luz	Escuro	16 h Luz	Escuro
BA	85,0 ± 11,1 ab*	98,0 ± 4,47a	50,0 ± 23,4 b	5,0 ± 5,0 c
TDZ	75,0 ± 11,1 ab	76,0 ± 16,7 ab	42,0 ± 4,4 b	42,0 ± 28,6 b
BA+TDZ	100,0 ± 0,0 a	90,0 ± 7,0 ab	88,0 ± 13,0 a	52,0 ± 10,9 b
MS	77,0 ± 8,3 ab	50,0 ± 5,0 b	20,0 ± 7,0 b	24,0 ± 26,0 bc

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si, a  $P \leq 0,05$ . \*Média ± SE.

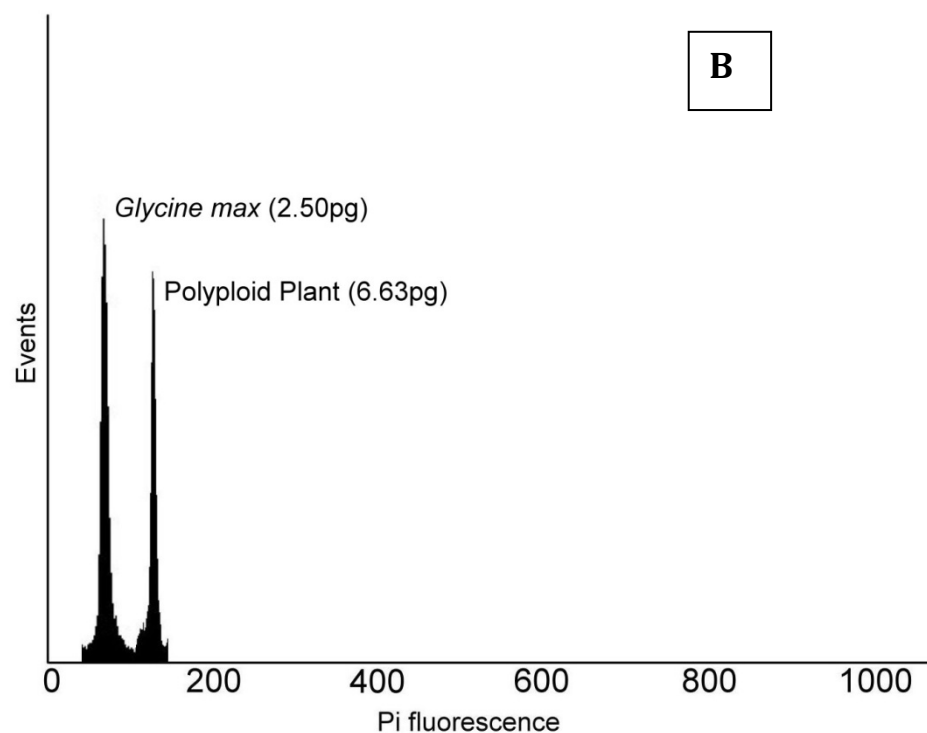
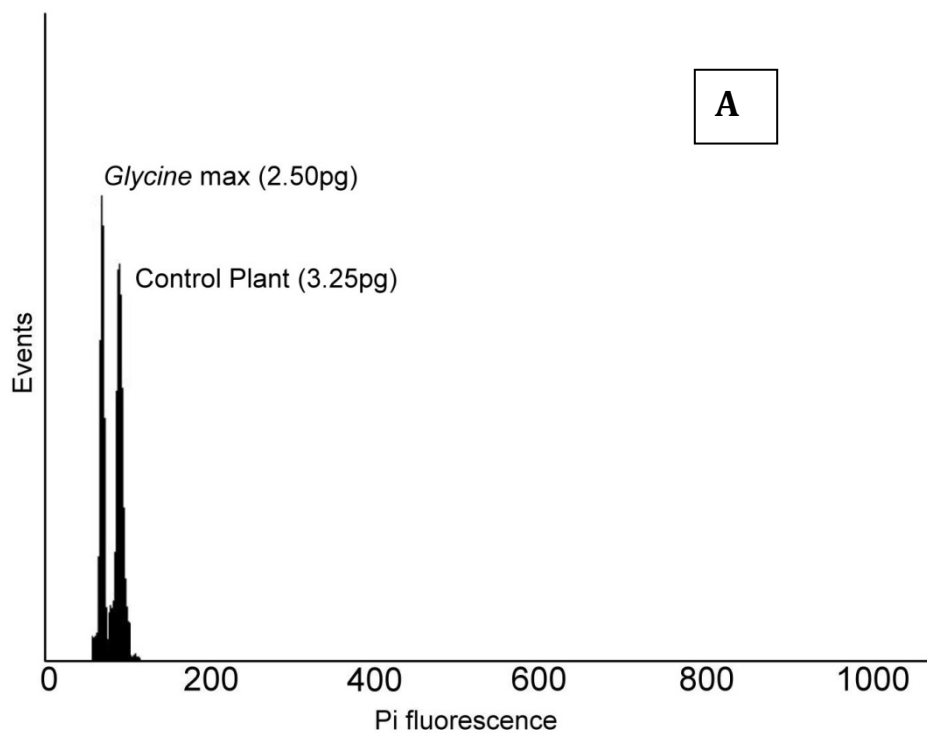
**Tabela 4.** Taxas de brotos alongados em explantes hipocotiledonares e radiculares de *Passiflora setacea* após 30 dias de cultivo em meio MS acrescido de GA<sub>3</sub>.

Meios de cultura	Hipocótilo (%)		Raiz (%)	
	16 h Luz	Escuro	16 h Luz	Escuro
BA	32,5 ± 12,5 ab*	7,5 ± 5,0 bc	47,5 ± 26,0 ab	0,0 ± 0,0 c
TDZ	7,5 ± 9,5 bc	0,0 ± 0,0 c	5,0 ± 10,0 bc	12,5 ± 18,9 bc
BA+TDZ	52,5 ± 37,7 a	12,5 ± 5,0 abc	80,0 ± 24,4 a	42,5 ± 29,8 abc
MS	20,0 ± 16,3 abc	12,5 ± 5,0 abc	0,0 ± 0,0 c	2,5 ± 5,0 bc

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si, a P≤0,05. \* Média ± SE.



**Figura 1.** Organogênese *in vitro* de *Passiflora setacea*. Caracterização morfológica (A-C) e histológica (D-F) após 30 dias de cultivo em meio de indução; **A:** Explante foliar com formação indireta de gemas (\*) no meio 1 (BA) na luz; **B:** Explante hipocotiledonar com formação indireta de brotações no meio 3 (BA+TDZ); **C:** Organogênese direta em explante radicular em meio 3 (BA+ TDZ); **D:** Explantes foliares (ef – seta) com gemas (\*), primórdios foliares (pf) e proliferação de calos (ca); **E:** Segmentos de hipocótilo apresentando gemas (\*), primórdios foliares (pf) e meristemóides (me) **F:** Segmento de raiz evidenciando organogênese direta com formação de gemas (\*) e primórdios foliares (pf); **G:** Explantes hipocotiledonares em meio MS acrescido de GA<sub>3</sub> para alongamento; **H:** Planta em fase de aclimatização; **I:** Plantas regeneradas. (D-E: cortes transversais em relação ao explante, F: corte longitudinal em relação ao explante.). Escalas: A e C: 1mm; B: 2mm e D-F: 300 µm.



**Figura 2.** Histograma da variação na estabilidade genética de *Passiflora setacea*. **A:** Picos da quantidade de DNA nuclear para *Glycine max* utilizada como padrão e a planta controle germinada *in vitro* a partir de sementes. **B:** Pico da quantidade de DNA nuclear em plantas identificadas como poliploides provenientes de explantes radiculares cultivados em meio de indução com BA+TDZ.

**Tabela 5** - Médias da quantidade de DNA (pg) determinadas por análise de citometria de fluxo de plantas regeneradas via seminífera, a partir de explantes hipocotiledonares e radiculares de *Passiflora setacea*.

Origem das plantas	Tratamentos	Média da quantidade de DNA (pg)	Coefficiente de Variação (%)
Semente	----	3,26 ± 0,03 b	1,12
Hipocótilo	BA	3,00 ± 0,20 b	6,78
	TDZ	3,22 ± 0,03 b	1,14
	BA+TDZ	3,27 ± 0,04 b	1,34
	MS	3,29 ± 0,08 b	2,44
Raiz	BA	3,38 ± 0,09 b	0,27
	TDZ	3,30 ± 0,04 b	1,45
	BA+TDZ	4,55 ± 1,74 a	37,47
	MS	3,10 ± 0,25 b	8,16

Média de 5 indivíduos analisados para cada tratamento.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A.; F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, p.307-315, 2009.
- ALEXANDRE, R. S.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M. M.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. In: Alexandre, R. S., Bruckner, C. H., Lopes, J. C. (Eds). Alegre – ES: Editora Edufes, p. 117-184, 2009.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* morphogenesis in leaf explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 2007-2013, 1999.
- ARAÚJO, G. P. **Novas variedades de maracujá ornamental**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/dezembro/1asemana/novas-variedades-de-maracujas-ornamentais/> Acesso 13 de janeiro de 2011.
- 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**, v. 57, p. 626-644, 2009.
- BECERRA, D. C.; FERNANDO, A. P.; GÓNGORA, G. G. 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**, v. 79, p. 87-90, 2004.
- BENNET, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. **Annals of Botany**, v. 86, p. 859-909, 2000.
- BEYL, C. J. Getting starting with tissue culture. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Eds). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, p. 21-38, 2000.
- BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUES, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 661-665, 2000.
- BRAGA, M. F.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SOUSA, A. A. T. C.; FALEIRO, F. G.; REZENDE, L. N.; JUNQUEIRA, K. P. Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 284-288, 2006.



- BRAGLIA, L.; BENEDETTI, L.; GIOVANNINI, A.; NICOLETTI, F.; BIANCHINI, C.; PIPINO, L.; MERCURI, A. *In vitro* plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**, v. 855, p.47-52, 2010.
- BURSENS, 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**, v. 211, p. 623–631, 2000.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploidy. **Nat. Rev. Genetic**, v. 6, p.836 – 846, 2005.
- CUCO, S. M.; VIEIRA, M. L. C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v. 58, p. 220–228, 2005.
- D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Development of adventitious shoots from *in vitro* grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration. **Biol Plantarum**, v. 49, p. 17-21, 2005.
- DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D. M.; BARROS, R. S.; FLOH, E. L. S.; OTONI, W. C. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 199-208, 2009.
- DOERNER, P. Cell Division Regulation. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA, p. 528-565, 2000.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99-110, 2005.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: Doležel, J., Greilhuber, J. e Suda, J. (Eds). **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, p.41-65, 2007a.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2233-2244, 2007b.
- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p. 211-217(1994).
- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 23-27, 1991.

- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; MEDINA-FILHO, H. P. Somaclonal and gametoclonal variation. **American Journal of Botany**, v. 77, p. 759–774, 1984.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; LEDO, C. A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; CUNHA, M. A. P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiros. **Bragantia**, v. 66, p. 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**, v. 33, p. 209–212, 1997b.
- FELISMINO, D. C. Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p. 112 2005.
- 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**, v. 91, p. 37–44, 2007.
- FRATINI, R.; RUIZ, M. N. Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.38, p. 46-51, 2002.
- FREITAS, I. M. N. Micropropagação *in vitro* de maracujazeiro. **Acta de Horticultura**, v. 18, p.103-106, 1997.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, (Publicação *on line*): DOI 10.1007/s11240-010-9892-4. (2010).
- GRAÇA, M. E. C.; FILHO, K. A. N.; MEDEIROS, A. C. S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilaminopurina e tidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 43, p. 107-112, 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L. S.; SILVA, J. R.; MACHADO, M. A. Cultura de tecidos de Maracujá. In: SÃO JOSÉ, A. R., FERREIRA, F. R. E VAZ, R. L. (Eds). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal, FUNEP, p. 61-77, 1991.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. E CALDAS, L. S. (Eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA/CNPH, p. 99-160, 1998.
- 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**, v. 48, p. 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**, v. 5, p. 1711–1723, 1993.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KHURANA-KAUL, V.; KACHHAWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 369-372, 2010.
- LARKIN, P.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p.197-214, 1981.
- LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. 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**, v. 50, p. 239–247, 2007.
- LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal**. Boletim de Biotecnologia, 22 dez. 2010. Disponível em: <<http://dequim.ist.utl.pt/bbio/77/pdf/citometria1.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2010.
- MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I. M.; AGUIAR, J. L. P.; AZEVEDO, J. A.; VASCONCELLOS, M. A. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá- doce: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. 1ª ed, Porto Alegre, Cinco Continentes, p. 198, 2005.
- MARTINEZ, M. C.; JØRGENSEN, 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. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 7360–7364, 1992.
- MELETTI, L. M. M.; FURLANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; FILHO, J. A. A. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O Agrônomo**, v. 54, p. 30-33, 2002.

- MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATTO, D. A. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, v. 22, p.95-104, 1994.
- MEYER, E. M.; TOUCHELL, D. H.; RANNEY, T. G. *In vitro* shoot regeneration and polyploid induction from leaves of *Hypericum* species. **HortScience**, v. 44, p. 1957-1961, 2009.
- MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKASAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 571-573, 2000.
- MORAN-ROBLES, M. J. Potentiel morphogénétique dès entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, v. 29, p.224-228, 1979.
- MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; GARCIA-LUIZ, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of *Troyer Citrange* differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, v. 85, p. 103-110, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NHUT, D. T.; KHIET, B. L. T.; THI, N. N.; THUY, D. T. T.; DUYN, N.; HAI, N. T.; HUYEN, P. X. High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) via thin cell layer (TCL) Technology. In: JAIN, S. M., HÄGGMAN, H. (Eds). **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer, p. 417-426, 2007.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. 1st edn. Termarcarphi Pty: Melbourne, p. 357, 1981.
- OLIVEIRA, J. C. Melhoramento genético. In: Ruggiero, C. (Ed). **Cultura de maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 218-246, 1987.
- OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, F. R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R.; FERREIRA, F. R.; VAZ, R. L. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, p. 211-246, 1991.
- OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 142-158, 2005.
- OTONI, W. C.; BLACKHALL, N. W.; D'UTRA VAZ, F. B.; CASALI, V. W. D.; POWER, J.B.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 777-785, 1995.

- PAIVA-NETO, V. B.; MOTA, T. R.; OTONI, W. C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annato (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, p. 32-38, 2003.
- PAIM-PINTO, D. L.; BARROS, B. A.; VICCINI, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; SILVA, M. L.; OTONI, W. C. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, p. 71-79, 2010.
- PASSOS, I. R. S.; BERNACCI, L. C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção do germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* sp.). In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V. E BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.361-383, 2005.
- PEREIRA, W. V. S.; VIEIRA, L. M.; REIS, S. B.; NEVES, S. C.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; RIBEIRO, M. L. Avaliação histoquímica em folhas de *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae). IX Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais, Brasília, DF. (2008). **Anais...**
- PINTO, A. P. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 28-33, 2010.
- RANNEY, T. G. Polyploidy: From evolution to new plant development. **Intl. Plant Proc. Soc.**, v. 56, p. 137-142, 2006.
- REIS, L. B.; SILVA, M. L.; LIMA, A. B. P.; OLIVEIRA, M. L. P.; PINTO, D. L. P.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, v. 738, p. 425-431, 2007.
- RIBAS, A. F.; DENISE, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R. A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, v. 32, p. 237-241, 2002.
- RIBEIRO, L. M.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, S. R. M. de.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; FONSECA, R. S.; VIEIRA, L. M. Organogênese *in vitro* em acessos de maracujazeiros amarelo infectados pelo vírus CABMV. **Unimontes Científica**, v. 8, p. 87-98, 2006.
- SAS. SAS/STAT® 9.1 Users Guid. SAS Institute In, Cary, North Carolina, USA. 2004.
- SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C.; SANTOS, F. C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, v. 57, p. 112-117, 2010.

- SILVA, C. V. Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis*. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. p. 82, 2009.
- SOUZA, M. M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; VIANA, A. P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**, v. 141, p. 131-38, 2004.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. Giberelinas: hormônio regulador da altura das plantas e da germinação de sementes. In: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds). **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed, p. 571 -599, 2009.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v. 62, p.346-350, 2005.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J.; MACIEL, S. C.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M. M. M.; REZENDE, J. A. M. Resistance to Passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Dis**, v. 90, p. 1026-1030, 2006.
- VICHIATO, M. R. M. Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orquidaceae). Lavras, MG. (Dissertação) Universidade Federal de Lavras, p. 80. 2005.
- WINKELMANN, T.; SANGWAN, R. S.; SCHWENKEL, H. G. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 400-404, 1998.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 272, 2009.
- ZERBINI, F. M.; OTONI, W. C.; VIEIRA, M. L. C. Transgenic passionfruit. In: KOLE, C.; HALL, T. (Eds). **A Compendium of Transgenic Crop Plants - Tropical and Subtropical Fruits and Nuts**. 1 ed. Berlin: John Wiley & Sons, p. 213-234, 2008.

## CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais em que os estudos foram conduzidos as seguintes conclusões podem ser auferidas:

### ✓ *Passiflora edulis* Sims:

- Constatou-se expressão do gene *AS1*, nas regiões epidérmicas e subepidérmicas de protuberâncias formadas em explantes radiculares a partir do 12º dia de inoculação em meio de indução de organogênese de ramos;
- A expressão do gene é restrita a região do domo e primórdios foliares após o 25º dia de inoculação;
- A técnica de hibridização *in situ* se mostrou eficaz na análise molecular dos processos de regeneração em raízes;

### ✓ *Passiflora setacea* D.C.

- Foi verificada formação de brotos em explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares quando cultivados no escuro;
- O acréscimo de BA ao meio de cultura foi indispensável para formação de brotações em segmentos de folha;
- O meio de cultura suplementado com BA na luz proporcionou maior número de brotações em explantes hipocotiledonares;
- A combinação de BA+TDZ na luz induziu maior número de brotações em explantes radiculares;
- Explantes hipocotiledonares e radiculares apresentaram melhor eficiência de regeneração;
- A citometria de fluxo indicou poliploidia em regenerantes oriundos de explantes radiculares cultivados com BA+TDZ presente no meio.